

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Sección de Biológicas. inéditas



TESIS DOCTORAL

**Metabolismo de insecticidas organoclorados por
microorganismos del suelo : mecanismos incidentes sobre el
aldrin-dieldrin en cultivos de diversas especies de hongos
aislados de suelos agrícolas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Miguel Ángel Murado García

Madrid, 2015

BIBLIOTECA UCM



5306705134

T 632.951

MUR

met

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION DE BIOLOGICAS



METABOLISMO DE INSECTICIDAS ORGANOCLORADOS POR MICRO-
ORGANISMOS DEL SUELO. MECANISMOS INCIDENTES SOBRE EL
ALDRIN / DIELDRIN EN CULTIVOS DE DIVERSAS ESPECIES DE
HONGOS AISLADOS DE SUELOS AGRICOLAS.

M E M O R I A

PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS BIOLOGICAS
POR

MIGUEL ANGEL MURADO GARCIA

N 23.581

MADRID, JULIO 1972

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Química Orgánica General del Patronato Juan de la Cierva, bajo la dirección del Dr. D. Gonzalo Baluja Marcos, a quien hago expresión de mi más profundo reconocimiento.

También agradezco a la Dirección del Instituto las facilidades concedidas para su terminación y a la Comisaría del Plan de Desarrollo la ayuda económica dispensada durante el periodo 1969 - 72.

Asimismo hago constar mi gratitud para con las personas y entidades que cito a continuación, por la orientación, consejo y facilidades que me han proporcionado en el desarrollo de técnicas o metodologías específicas:

Profesores F. Korte y W. Klein por su esencial auxilio en el campo de la espectrometría de masas, -- Dr. J. Robinson por el suministro de una valiosa -- muestra metabólica, Profesor E. Hernández, Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas, Departamento de Bioquímica de la Universidad Complutense y Dr. M. Dabrio, así como a D. J. M. Franco Soler por su constante colaboración como inestimable compañero de laboratorio.

Finalmente, debo hacer constar mi deuda para con todas aquellas personas que anónimamente han contribuido a dar forma final a esta Memoria.

I N D I C EPág.

PARTE I : CONSIDERACIONES TEORICAS

1 - Evolución histórica de los plaguicidas. Problemática de la situación actual.....	2
2 - Insecticidas: clasificación; características.....	11
2.1 - Modo de acción.....	15
2.2 - Formas de toxicidad.....	21
3 - Los insecticidas y el medio ambiente.....	26
3.1 - Los factores determinantes de la contaminación ambiental: diseminación, persistencia, acumulación.....	29
3.2 - Consideraciones críticas sobre la degradación de los insecticidas.....	40
3.3 - Las transformaciones de los insecticidas ciclodiénicos en relación con su toxicidad.....	46
3.4 - La significación del aldrín como estructura susceptible de transformación en el medio.....	54
3.5 - El metabolismo de aldrín y dieldrín por microorganismos.....	62

PARTE II : TECNICA EXPERIMENTAL

1 - Metodología; justificación de la misma.....	69
1.1 - Métodos para el aislamiento y-cultivo de hongos de suelos agrícolas.....	72
1.2 - Planteamiento general de las--experiencias.de incubación.....	75
1.2.1 - Incorporación del insectici-da a los medios de cultivo.....	76
1.2.2 - Controles. Condiciones de in-cubación.....	77
1.2.3 - Medios de cultivo.....	80
1.3 - Sistemas para la extracción de los productos de biotransformación.....	83
1.4 - Purificación de los extractos.....	85
1.4.1 - Reparto entre disolventes in-miscibles.....	86
a - Reparto hexano / dimetilforma-mida.....	87
b - Reparto hexano / acetonitrilo.....	90
1.4.2 - Cromatografía de adsorción.....	90
1.5 - Análisis de los extractos.....	93
1.5.1 - Cromatografía en capa fina.....	93
a - Preparación de placas.....	93
b - Reactivo cromogénico y revela-do.....	94
c - Sistemas de desarrollo.....	95
1.5.2 - Cromatografía gas - líquido.....	96
a - La columna cromatográfica.....	98

b - La detección por captura elec <u>trónica</u>	107
c - Confirmación de epóxidos.....	111
1.5.3 - Centelleo líquido.....	112
1.6 - Fraccionamiento de los extrac <u>tos</u> . Purificación y estudio de los metabo <u>litos</u>	113
1.6.1 - Metabolitos solubles en disol <u>ventes</u> orgánicos.....	114
1.6.2 - Metabolitos hidrofílicos.....	115
1.6.3 - Espectros en el IR.....	115
1.6.4 - Espectros de masas.....	117
PARTE III : RESULTADOS Y SU INTERPRETACION	
1 - Características generales del sue <u>lo</u> de procedencia de los microorganismos- ensayados.....	119
2 - La utilización de aldrín y diel <u>drín</u> por los microorganismos.....	123
3 - Características de la transforma <u>ción</u> del aldrín y el dieldrín por los mi- croorganismos.....	126
3.1 - El metabolismo del aldrín por- Penicillium glaucum.....	128
3.1.1 - Resultados cromatográficos.....	129
3.1.2 - Las vías de transformación-- del aldrín. Factores que las afectan.....	132
3.1.3 - Purificación de los metabo-- litos y estudio estructural de los mismos.....	137

3.2 - Metabolismo del aldrín cuando-- se forman proporciones importantes de meta bolitos hidrofílicos.....	146
4 - Repercusión del insecticida sobre los microorganismos.....	165
PARTE IV : RESUMEN DE LAS CONCLUSIONES.....	173
BIBLIOGRAFIA.....	179

P A R T E I

C O N S I D E R A C I O N E S
T E O R I C A S

E V O L U C I O N H I S T O R I C A
D E L O S P L A G U I C I D A S

P R O B L E M A T I C A
D E L A

S I T U A C I O N A C T U A L

1 - EVOLUCION HISTORICA DE LOS PLAGUICIDAS. PROBLEMA- TICA DE LA SITUACION ACTUAL.

Como ocurre en buena parte de los aspectos del saber humano, si nos remontamos en busca de los orígenes de la lucha del hombre contra las plagas, hallaremos en la civilización griega los primeros datos significativos. En efecto, ya en Homero y, posteriormente, en la multiforme obra de Demócrito se reflejan conocimientos concretos sobre el problema, llegando a mencionarse diversos procedimientos para combatirlo. Es asimismo muy posible que ya en épocas anteriores se hubiera el hombre enfrentado, de un modo u otro, con las plagas: resulta, por ejemplo, fácil de hacer este supuesto en el caso de las culturas mesopotámicas y egipcia, de avanzado grado de desarrollo y estrechamente vinculadas a la agricultura.

No obstante sus remotos antecedentes, la metodología de la lucha contra las plagas sigue una evolución extremadamente lenta y a lo largo de muchos siglos se registra un escaso o nulo perfeccionamiento de los procedimientos: a los más primitivos métodos mecánicos, "atrapadores", van sumándose poco a poco otros basados en la utilización de sustancias inorgánicas (azufre, algunas sales de cobre, cinc, plomo, mercurio, arsénico) o productos orgánicos naturales (aceite de piretro, nicotina, sabadilla) y la-

situación se prolonga con estas características hasta casi mediado el siglo XX.

Por estas fechas, el descubrimiento de las propiedades insecticidas del DDT (Müller, 1939) constituye realmente un hito en la evolución que estamos estudiando. A partir de este momento, tras los éxitos obtenidos con el nuevo producto, se inicia una etapa de intensa actividad en este campo que da como resultado el desarrollo de una cantidad verdaderamente notable de formulaciones plaguicidas, en su inmensa mayoría de naturaleza orgánico-sintética, que desplazan rápidamente a la casi totalidad de los medios tradicionales.

La fabulosa explosión demográfica que experimenta la humanidad desde finales del siglo XIX gracias al desarrollo de los medios sanitarios y la mejora en la alimentación, y pese a las consecuencias de dos guerras mundiales, pone al hombre en una situación en la cual, de no lograrse un incremento de los recursos alimenticios en concordancia con el incremento de la población, se corre el peligro de entrar en una cinética de tipo malthusiano que algunos especialistas no ven muy lejana: refiriéndose a este problema, Robert U. Ayres¹ dice: "Si no se logra una aportación fundamental de una nueva fuente de alimentos, habrá que reconocer, en justicia, que la profecía de Malthus parece tener demasiadas probabilidades de hacerse verdadera". Esta perentoria necesidad de elevar la producción de alimentos, y, dado que las plagas constituyen uno de los principales agentes depresores del rendimiento agrícola, es la causa---

fundamental del auge experimentado en el transcurso de pocos años por la industria de los plaguicidas. Durante las últimas décadas las aplicaciones de toda la gama de nuevos productos lanzados con éxito al mercado han sido masivas y, por otra parte, trascendiendo los límites de su utilización para fines agrícolas, se han prodigado asimismo abundantemente a nivel industrial e incluso doméstico.

A título meramente informativo, las tablas I y II, y la figura 1, pretenden proporcionar una idea general sobre los aspectos cuantitativos, de índole técnica y económica, implicados en el fenómeno que aludimos.

TABLA I - Producciones agrícolas y pérdidas ocasionadas por plagas de insectos, estimadas en conjunto para Europa, Asia, Africa, América (Sur y Centro) y Oceanía.
(Fuente: Pflanzenschutz Nachrichten Bayer, 1967)

Cosecha	Producción (miles Tons)	Pérdidas (miles Tons)	Causadas por insectos (%)
Algodón (excepto Oceanía)	5093		17,7
Trigo, avena, cebada, centeno	201201	11213	5,57
Maíz	87461	20135	23
Huerta	182059	20865	11,46
Remolacha azucarera (excepto Africa, Oceanía y América Central)	108554	9735	8,96
Tabaco	2933	443	15,10
Oleaginosas	42479	9345	22

TABLA II - Consumo mundial de insecticidas agrícolas en 1966, estimado según tipo de cosechas.
(Fuente: Shell International Co.)

Cosecha	Insecticidas totales (miles Tons)	% correspondiente a insecticidas clorados
Algodón	60,4	38
Arroz	12,0	57
Otros cereales	7,6	85
Verduras y pro- ductos huerta	6,8	46
Patatas	2,8	61
Remolacha azucarera	2,4	55
Caña de azúcar	2,1	74
Tabaco	2,0	67
Oleaginosas	1,9	77
Café	0,8	81
Té	0,5	19
Boniato	0,2	92

Los efectos inmediatos de los tratamientos con los nuevos plaguicidas fueron altamente satisfactorios, quedando fuera de toda duda los enormes beneficios, no sólo de índole agrícola, derivados de su utilización. Baste decir, por ejemplo, que, en ciertas modalidades de cultivo, los rendimientos se elevaron en un 180 %, que extensas zonas insalubres, prácticamente inhabitables por la amenaza de enfermedades endémicas, generalmente transmitidas por insectos, han quedado aptas para la coloniza---

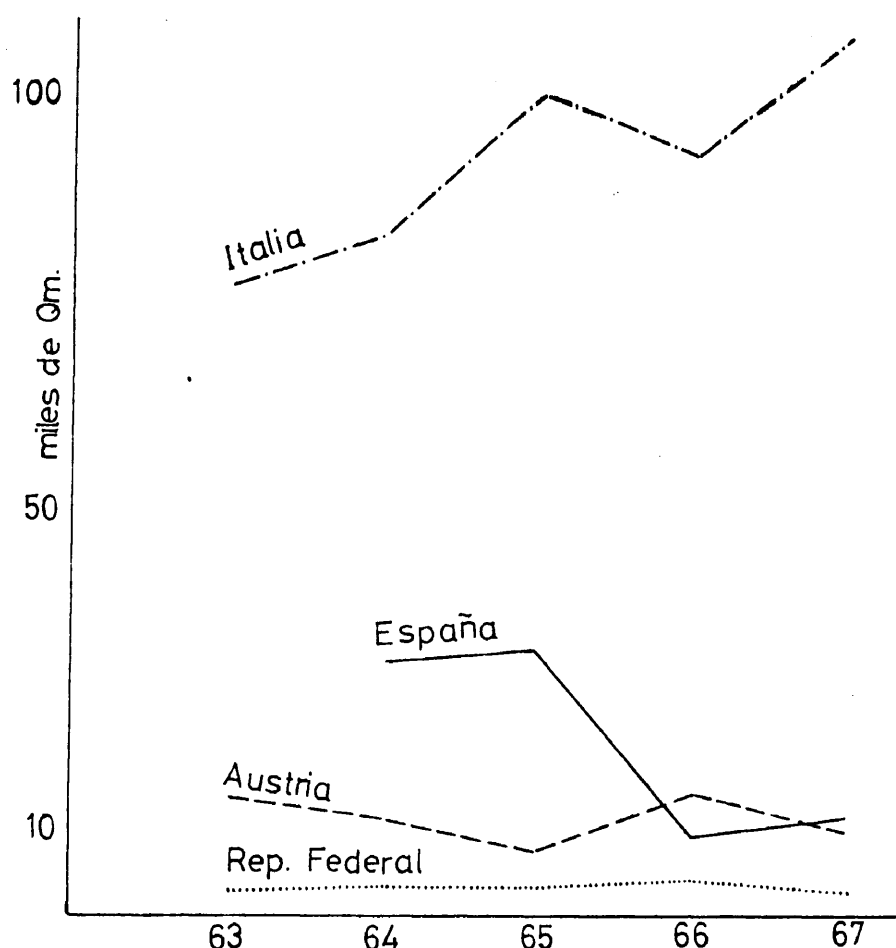


Fig. 1 - Consumo de insecticidas clorados en diversos países europeos durante el periodo 1963 - 67. (Fuente: Anuario Estadístico de la F.A.O.)

ción, y que parásitos domésticos tan enojosos, cuando no peligrosos por actuar como vectores de microorganismos patógenos, como las cucarachas, chinches, pulgas y piojos, han sido drásticamente eliminados de las zonas civilizadas.

Sin embargo, en 1962 se publica la primera obra que ---- constituye una réplica alusiva a los aspectos negativos presentes en la actual metodología de la lucha contra las plagas. En efecto, la bióloga norteamericana Rachel Carson de-

nuncia, en su "Primavera silenciosa",² el peligro entrañado para la integridad de los sistemas ecológicos por las frecuentes aplicaciones masivas de los modernos productos, cuyos residuos, que pueden permanecer durante periodos más o menos dilatados de tiempo contaminando el medio, al actuar de modo indirecto a través de las cadenas alimenticias, alcanzan y dañan a formas de vida diferentes de aquellas a cuyo ataque fueron destinados.

La repercusión de esta obra sobre la opinión pública puede calificarse de espectacular y muy pronto los medios informativos se hicieron eco, en ocasiones de un modo excesivamente sensacionalista, de opiniones de todas las tendencias, emitidas, muchas veces con marcado carácter polémico, por especialistas de los campos en mayor o menor grado relacionados con la problemática puesta de manifiesto por Rachel Carson. Esta situación motivó la creación en los EEUU de una comisión, con rango de asesora científica de la Presidencia, encargada de reunir y valorar toda la información concerniente al caso. Los resultados de los estudios de tal comisión, si bien limaron los sensacionalismos, confirmaron en gran parte las tesis fundamentales de "Primavera silenciosa", concluyendo que, en efecto, se estaba asistiendo a un proceso gradual de contaminación del medio ambiente, originado por los residuos, en ciertos casos de gran persistencia, de las nuevas formulaciones plaguicidas. No se llegó, por el contrario, a conclusiones definidas en cuanto al significado de este hecho a un nivel biológico, aunque se puso de manifiesto la urgencia de emprender estudios en este sentido. Al mismo tiempo, se su-

girió la intervención de los organismos gubernativos competentes en la regulación de los métodos a seguir en los tratamientos de plagas, a fin de impedir las aplicaciones abusivas que con frecuencia venían dándose.

Desde entonces se suceden en todo el mundo intensos debates que mantienen el problema en constante actualidad y en los que intervienen varias organizaciones internacionales (O.C.D.E., F.A.O., O.M.S.), y los resultados de numerosos estudios llevados a cabo en diversos países proporcionan una información cada vez más completa y detallada sobre el tema. Hoy se conocen ya muchos aspectos cualitativos, cuantitativos y dinámicos del proceso de contaminación y se ha determinado sin lugar a dudas su extensión mundial (resulta ya tópica la cita de residuos de plaguicidas en las faunas polares), lo cual ha llevado a que, en los últimos tiempos, varios países hayan prohibido formalmente la utilización de determinados productos y dictado medidas restrictivas más o menos enérgicas con relación a otros.

No obstante los considerables avances realizados sobre esta temática durante el transcurso de las últimas investigaciones, continúan siendo relativamente escasos los puntos en donde se ha llegado a conclusiones tajantes de general aceptación, particularmente en lo que se refiere a la repercusión de la contaminación residual sobre los equilibrios ecológicos. Es de subrayar que esta materia suele ser objeto de fuerte controversia entre aquellos sectores de opinión que valoran en más los resultados positivos que

los efectos secundarios de los plaguicidas, frente a aquellos otros que hacen hincapié en los aspectos negativos de tales productos, sorprendiendo, en ocasiones, hallar en la abundante bibliografía al respecto, interpretaciones divergentes extraídas de series de hechos paralelos.

En los apartados que siguen, trataremos de efectuar--- una aproximación objetiva al tema, esquematizando las líneas fundamentales de investigación que se han seguido hasta el momento y justificando al mismo tiempo nuestro particular enfoque experimental.

I N S E C T I C I D A S :
C L A S I F I C A C I O N
Y
C A R A C T E R I S T I C A S

2 - INSECTICIDAS: CLASIFICACION; CARACTERISTICAS.

De entre los numerosos tipos de productos plaguicidas que en la actualidad se conocen y emplean (alrededor de-- 200 estructuras básicas a partir de las cuales se han preparado más de 70.000 formulaciones comerciales que abarcan rodenticidas, vermícidias, insecticidas, acaricidas, herbicidas, fungicidas...), son con todo seguridad los insecticidas los que han alcanzado una superior difusión, como consecuencia del éxito biológico de los Insectos, al menos por lo que se refiere a su capacidad de adaptación y colonización de los más diversos ambientes. Esta capacidad, sólo comparable a la del hombre, es causa de una competencia de mayor o menor intensidad según las latitudes, entre ambos grupos biológicos a todo lo largo de la superficie del planeta.

En la tabla III, que en modo alguno trata de aparecer exhaustiva, se anotan los principales insecticidas organosintéticos de uso común en las formulaciones comerciales, junto con sus respectivas toxicidades (dadas en ppm dieta rata), clasificados, según el criterio químico más usual, en tres grandes grupos: órganoclorados, órganofosforados y carbamatos.

Dentro de los órganoclorados, grupo de gran interés--

TABLA III - Insecticidas de más frecuente utilización.

			DL ₅₀ (ppm)
			<hr/>
CLORADOS.....		H.C.H	600
		Lindano	125
		Aldrín	67
		Isodrín	
		Dieldrín	87
		Endrín	20
		Heptacloro	68-116
		Clordano	450
		O.D.T.	250
		Keltano	809
		Rotano	3400
		Metoxicloro	5700
		Toxafeno	50
		Tiodán	110
		Tedión	10000
FOSFORADOS	Fosfonatos.....	Dipterex	500
		Fosfamidón	56-107
	Fosfatos.....	Dibrom	430
		Fosdrín	6-8
		Paration	3
		Sistox	2,5-14
		Metasistox	65-120
		Clortion	1500
		Ronnel	
		Dimetoato	215
	Tiofosfatos.....	Etion	
		Malation	1500
		Timet	1-5
		Gution	10-18
		Trition	30-90
		Metiltritition	200-390
CARBAMATOS	Monometil-carbamatos.....	Sevin	540-560
		Zectrán	
	Dimetil-carbamatos.....	Dimetán	120-150
		Dimetilán	55-65
		Isolán	9-18
		Pirolán	62-90

a causa de lo extensivo de su utilización, hecho que, por otra parte, viene motivado por razones de índole económica así como por la simplicidad de las manipulaciones que requieren, conviene, a su vez, considerar tres subgrupos:

1 - Derivados del 2,2 - difeniletano. Como ejemplos--característicos pueden citarse el metoxicloro y el DDT con sus derivados.

2 - Derivados del ciclohexano, entre los cuales constituye el lindano el caso más representativo.

3 - Derivados del hexaclorociclopentadieno a través--de la síntesis de Diels - Alder (ciclodiénicos), de los cuales puede tomarse el aldrín como ejemplo característico y a los cuales dedicaremos en esta memoria atención preferente.

2.1 - MODO DE ACCION.

Para considerar el modo de acción de los insecticidas resulta de utilidad seguir el criterio clasificatorio de la tabla III y estudiar por separado los tres grandes grupos antes mencionados de órganoclorados, órganofosforados y carbamatos.

5306705-174
Con respecto a los primeros, no se conoce todavía con suficiente exactitud, y pese a la abundante bibliografía-- al respecto, el mecanismo preciso del ataque, si bien existen resultados que ilustran determinados casos particulares. En general, dos categorías de hechos parecen claras:-- por una parte, los síntomas que presentan los insectos atacados por insecticidas clorados (hiperexcitabilidad, convulsiones), delatan profundas alteraciones del sistema--- nervioso; por otra parte, tales compuestos no parecen actuar, contrariamente a lo que ocurre con los órganofosforados y los carbamatos, por inhibición de ninguna enzima-- conocida.

En relación con el DDT, no parece muy consistente la hipótesis que atribuye su toxicidad a la liberación de ácido clorhídrico como resultado de su descomposición en el cuerpo del insecto. Las estirpes DDT - resistentes están-- dotadas de una enzima, la DDT - asa, que acelera el paso-- de DDT a su derivado dicloroetilénico, DDE, sin que el ClH liberado afecte su organismo. El hecho de que en numerosas

especies de insectos se haya comprobado que entre los efectos del DDT se cuenta la disminución en la concentración de prolina hemolinfática, acompañada de un aumento correlativo de alanina (transformación que ciertos insectos utilizan como fuente de energía durante el vuelo),³ apunta hacia un efecto de hiperactividad muscular que concuerda con los síntomas antes descritos. T. Narahashi⁴ (1969) ha publicado una buena revisión sobre los mecanismos implicados, a nivel celular y molecular, en la acción del DDT y aletrín sobre el sistema nervioso.

Por otra parte,³ existen indicios de que el hexacloruro de benceno, cuya estructura molecular es semejante a la del inositol, interfiere en los insectos con el metabolismo de los lípidos de inositol. Este compuesto no alivia los síntomas del envenenamiento agudo por hexacloruro de benceno, pero sí contrarresta los efectos de dosis subletales del insecticida, uno de los cuales consiste en la acumulación de cantidades extraordinariamente elevadas de colesterol en los tejidos, lo cual hace pensar en el complejo lipoproteín - esterol de la estructura celular como punto vulnerable al ataque.

Existen buenas revisiones⁵⁶ sobre el tema de la correlación estructura química - actividad insecticida y, en relación con los organoclorados, se admite, en términos generales, que su toxicidad se debe a que, por su carácter hidrofóbico, son capaces de asociarse con notable rapidez a los sistemas lipídicos del organismo, lo cual, a nivel de membrana celular, se traduce en una alteración de sus pro-

propiedades de permeabilidad. Los fenómenos de transporte iónico, fundamentales para el funcionamiento de cualquier tipo de tejido, pero muy especialmente para el desarrollo de las funciones específicas del sistema nervioso (en cuyos tejidos, por otra parte, se encuentra una importante fracción lipídica, tanto desde un punto de vista cuantitativo como cualitativo), se ven, de este modo, profundamente alterados.

Mucho más completo es el conocimiento que hoy se tiene sobre el modo de acción de los insecticidas órganofosforados, grupo en el que, de otro lado, ha sido posible---llevar más lejos el estudio de la correlación estructura--química - actividad biológica, siendo ya posible, en la actualidad, esquematizar estructuras con no pocas propiedades biológicas prejuzgadas.⁷

Estos productos deben su toxicidad a la acción inhibitoria que ejercen sobre la acetilcolinesterasa: mimetizando a la acetilcolina, los insecticidas órganofosforados ocupan los centros activos de la enzima, impidiendo de este modo su asociación con aquélla, como consecuencia de lo cual tiene lugar una acumulación de acetilcolina que acaba provocando un desarreglo de las vías nerviosas y numerosos órganos efectores, por falta de interrupción de los impulsos eléctricos en los cuales la acetilcolina actúa como mediador químico.

Además de las colinesterasas, el organismo animal posee otras carboxiesterasas, clasificables en aliesterasas-

y arilesterasas, de especificidad por lo general amplia y variadas implicaciones metabólicas. Las arilesterasas ofrecen bastante resistencia a la acción de los insecticidas--organofosforados, pero las aliesterasas resultan tan fuertemente inhibidas por ellos, que llegó a discutirse si ésta era la verdadera causa de su toxicidad.³ Hoy se considera, de todos modos, más significativa su acción sobre las colinesterasas.

Permanecen, sin embargo, sin aclaración totalmente satisfactoria, determinados aspectos de la toxicología de estos insecticidas: por ejemplo, el hecho de que ciertos antagonistas de la intoxicación por acetilcolina, como la---atropina, efectivos en animales superiores, no lo sean en insectos, parece sugerir diferencias en los mecanismos tóxicos, dependientes del nivel de la escala animal afectado. Apoyan asimismo esta hipótesis razones como la ineffectividad de algunos inhibidores colinesterásicos de animales superiores, cuando se aplican a insectos.

Los carbamatos, esteres del ácido carbámico, de fórmula general $\begin{matrix} R_1 \\ R_2 \end{matrix} > N - C \begin{matrix} \searrow O \\ \swarrow O - R_3 \end{matrix}$, ejercen asimismo efecto inhibitorio sobre varias carboxiesterasas, si bien su acción es más restringida que la de los compuestos organofosforados, ya que alcanza a las colinesterasas y aliesterasas,--pero no a las arilesterasas. Por otra parte, la inhibición es, al contrario que la provocada por aquéllos, lentamente reversible.

Si se consideran pues, en su conjunto, las acciones--

en virtud de las cuales ejercen los insecticidas su actividad tóxica, se llega a la conclusión de que vulneran mecanismos biológicos de baja especificidad, es decir, resultan escasamente selectivos. En efecto, las interacciones químicas que gobiernan la transmisión de los impulsos nerviosos son esencialmente de la misma naturaleza a todo lo largo de la escala animal, desde las formas en que tal actividad comienza a manifestarse, hasta el hombre, por lo que, en principio, no existen demasiadas razones para atribuir a los insecticidas una acción excesivamente restringida.

Claro que, en la práctica, existen notables diferencias de orden cuantitativo entre las dosis letales para diferentes grupos animales, a lo cual hay que añadir el hecho de que, en muchas ocasiones, los productos que vehiculan al insecticida le confieren una gran aptitud para alcanzar vías de penetración típicas de los insectos, al mismo tiempo que lo hacen poco idóneo para llegar a las demás formas animales. Otras veces, la vía de penetración normalmente alcanzada en los animales superiores resulta inadecuada para que el tóxico ejerza su efecto: tal es el caso de numerosos compuestos fosforados cuando se administran por vía oral, ya que en su recorrido a lo largo del tubo digestivo, en contacto con la serie de sistemas enzimáticos presentes en el mismo, acaban por sufrir hidrólisis que aminoran o incluso anulan su toxicidad (aquí hay que señalar, como contrapartida, que puede darse el caso de que la acción metabólica active el tóxico). También puede ocurrir que determinado principio activo sea suscep-

tible de una rápida excreción por parte de organismos superiores, no existiendo un proceso paralelo entre los insectos.

Con todo, la primera conclusión, si no del todo rigurosa, resulta válida en líneas generales y, con el respaldo de una autoridad en la materia como N. W. Moore⁸, se puede afirmar que "... por desgracia, no existe un plaguicida que limite sus efectos exclusivamente a la plaga para la-- que se lo ha inventado".

2.2 - FORMAS DE TOXICIDAD.

El problema de la toxicidad de los plaguicidas resulta de gran complejidad, no sólo por los diversos aspectos que abarca, sino también por las numerosas implicaciones-- secundarias que pueden acompañarle y que dificultan su estudio hasta el punto de que, en muchas ocasiones, son totalmente impredecibles los efectos a largo plazo aun de--- productos cuya acción inmediata se conoce con detalle.

Durante los últimos años se ha tratado el tema de un modo exhaustivo por un gran número de autores, razón por-- la cual aquí no ensayaremos más que a afectar un intento-- sistemático del mismo, con objeto de poder centrarnos posteriormente en aquellos aspectos que nos interesan de un-- modo específico.

A este fin, los efectos tóxicos de los plaguicidas en general y de los insecticidas en particular, pueden clasificarse en los siguientes grupos:

I - Derivados de la acción directa del principio acti
vo:

- 1 - Producidos por una acción inmediata del mismo, determinada por la ingestión (o cual--- quier otra forma de penetración) de una sola dosis. En este caso se habla de toxicidad aguda.

2 - Producidos por una acción diferida del principio activo, determinada por la administración de dosis subletales prolongadas. En tales circunstancias se habla de toxicidad residual.

2.a - Toxicidad subaguda: concepto que se refiere a los efectos estudiables durante un---plazo, convencional, de 4 a 16 semanas.

2.b - Toxicidad crónica: se refiere a los efectos a plazos que comprenden toda la vida--del animal de experimentación, pudiendo incluso trascender tal periodo en aquellos--de ciclo reproductor breve (efectos sobre la descendencia).

II - Derivados de la interacción del principio activo con factores presentes en:

1 - La formulación aplicada (fenómenos de sinergismo).

2 - El sustrato sobre el que se aplica (caso de los insecticidas sistémicos).

La medida de la toxicidad aguda constituye el primer-bioensayo obligado que se realiza sobre cada nuevo compues-to antes de su comercialización, ya que resulta esencial--para obtener una primera estimación de su viabilidad prác-tica, y se define en función de la repercusión fisiológica que se registra en un organismo de experimentación, como--consecuencia de la aplicación de una dosis de tóxico por--una sola vez, denominándose dosis letal 50 % (DL₅₀) a la cantidad de tóxico necesaria para ocasionar una mortalidad

del 50 % entre los animales sometidos a prueba. Acostumbra a utilizarse la parte por millón (ppm), equivalente a los mg de tóxico por Kg de peso del animal de ensayo, como unidad de medida de la DL₅₀, hablándose, según la vía de penetración, de toxicidad aguda oral, dérmica, por inhalación, parenteral, subcutánea, ocular, etc.

Por otra parte, conviene destacar que la toxicidad de un plaguicida es susceptible de verse sujeta a variaciones, a veces considerables, dependientes de la vía de penetra--ción, los agentes vehiculantes, el sexo del animal de ex--perimentación, su edad, su estado nutricional y el grado--de pureza del producto. A este último respecto, debe señalarse que los productos técnicos suelen presentar un grado de toxicidad más elevado que el de los químicamente puros, ya que, al encontrarse con frecuencia en los primeros mezclas de varios principios activos, pueden tener lugar fe--nómenos de sinergismo que multipliquen los efectos de los--segundos (y ello es precisamente lo que se busca en mu---chas formulaciones mixtas).

Pese a su importancia, cuando se estudian los efectos laterales, no buscados, de los plaguicidas, no es su toxicidad aguda el aspecto más interesante a considerar en la--toxicología de los mismos, puesto que constituye un factor perfectamente definido, cuyas repercusiones son suscepti--bles de delimitarse con exactitud y ser sometidas a con---trol. En efecto, los envenenamientos agudos son fácilmente evitables si durante la manipulación de estos productos se, observan las precauciones establecidas en cada caso. Son--

precisamente las formas de toxicidad que se clasifican en los restantes apartados aquellas que, por constituir el--- producto de acciones más difusas y complejas, a menudo resultan difíciles de prever y aún de interpretar correctamente. El contacto continuado con ambientes contaminados o la ingestión de alimentos portadores de residuos tóxicos, ya intactos, ya modificados en su estructura a través de-- la dinámica física, química y biológica del medio ambiente, puede determinar la acumulación en el organismo, por suma-- de dosis difícilmente detectables individualmente, de nive-- les de productos activos susceptibles de provocar efectos-- incluso alejados de los característicos del envenenamiento agudo.

En la tabla IV se recogen esquemáticamente algunos ca sos que ilustran la situación con respecto a los efectos-- de algunos plaguicidas sobre el organismo de animales supe riores.

TABLA IV - Efectos de algunos plaguicidas sobre el organismo de animales superiores.

(Fuente: H. van Henderen; Bull. Inst. Agron. Stat. Rech. Gembloux; 3, 1236. 1960).

COMPUESTO	EFFECTO MINIMO Y DOSIS MAX. (ppm DIETA RATA) A LA QUE NO SE MANIFIESTA	EFFECTO CARACTERISTI CO A DOSIS ELEVADAS
Aldrín	Lesiones hepáticas. Afecta reproducción. <u>2,5</u>	Lesiones hepáticas. Excitación SNC.
Dieldrín	Hipertrofia hepática. Afecta reproducción. <u>1</u>	Como aldrín. Hipertrofia renal.
Endrín	Retardo crecimiento. Hipertrofia hepática y renal. <u>1</u>	Excitación SNC. Degeneración cerebro, hígado y riñón. Pérdida de peso.
DDT	Lesiones hepáticas. <u>1</u>	Como aldrín. Crecimiento retardado.
Lindano	Alteraciones histológicas hepáticas y renales. <u>10</u>	Como aldrín.
Pertano	Retardo crecimiento. Alteraciones histológicas hepáticas. <u>500-1000</u>	
Tiodan	<u>30</u>	Alteraciones hepáticas y renales.
Tiram	Calambres. Intolerancia al cohólica. <u>48</u>	Desorientación. Alteraciones histológicas cerebrales.
Zineb	Hipertiroidismo. <u>500</u>	Retardo crecimiento. Propiedades groitrogénicas.
Tecnazen	Retardo crecimiento. <u>800</u>	Hipertrofia hepática. Diarreas.
Fenilfenolato-Na	Depresión crecimiento. <u>2000</u>	Lesiones hepáticas y renales.
Organomercúricos	Depresión crecimiento. Lesiones renales. <u>0,1</u>	Lesiones renales.

LOS INSECTICIDAS
Y
EL
MEDIO AMBIENTE

3 - LOS INSECTICIDAS Y EL MEDIO AMBIENTE.

Los numerosos estudios emprendidos en todos los países del mundo como consecuencia más o menos directa de la alarma despertada por Rachel Carson, constataron una progresiva contaminación a nivel mundial de la biosfera, así como de los elementos que la soportan: suelo, agua y aire.

Pese a la controversia, que ya aludimos, sobre las consecuencias de este fenómeno, en la actualidad son muchos los autores de reconocido prestigio que sostienen que la utilización de hidrocarburos clorados, al menos en la forma incontrolada en que venía efectuándose, amenaza numerosas formas de vida, incluido el hombre. Existe ya información concreta, nada escasa, que prueba que el proceso de extinción de varias especies animales, particularmente aves de rapiña tales como el águila calva y el halcón peregrino, se encuentra notablemente avanzado a causa de disfunciones en el metabolismo del calcio, provocadas por productos del grupo del DDT, que determinan una excesiva delicadeza en la cáscara de sus huevos, los cuales rompen en el nido antes de la eclosión.

Los efectos acumulativos a lo largo de las cadenas de alimentación resultan en muchos casos notorios, y la situación puede resumirse en pocas palabras diciendo que las---

especies carnívoras concentran residuos en su organismo a causa de su alimentación a base de herbívoros, los cuales, a su vez, los han concentrado a partir de las grandes cantidades de sustancia vegetal que ingieren. Los problemas-- de orden ecológico que pueden derivar (y que de hecho están surgiendo) de tal situación, son a todas luces graves, pues el hombre no puede suprimir impunemente ningún elemento de un equilibrio en el que él mismo se encuentra inmerso; pero aún prescindiendo de este aspecto que, siguiendo un criterio un tanto optimista, podríamos denominar de alcance indirecto, el mismo hombre, por su particular posición de superpredador, en la cúspide de la pirámide trófica, constituye el blanco último del proceso de acumulación.

En este punto, nos parece ilustrativo recordar lo que, al respecto, dice L. R. Brown:⁹ "Resulta irónico pensar que sólo una generación después de haberse concedido a Paul H. Müller el Premio Nobel (1948), por el descubrimiento del DDT, la ley comience a prohibir en muchos países la utilización de dicho insecticida. Ello proporciona una idea de lo poco que sabe el hombre sobre los efectos de su intervención en la biosfera, que hasta ahora, a veces con desgraciados resultados, se ha estado utilizando como un laboratorio".

3.1 - LOS FACTORES DETERMINANTES DE LA CONTAMINACION-AMBIENTAL: DISEMINACION, PERSISTENCIA, ACUMULACION.

El primer paso del complejo proceso de diseminación--de un insecticida lo da el hombre cuando lo aplica. En efecto, en la totalidad o casi totalidad de los productos clásicos actualmente en el mercado, la metodología de la aplicación es tal, que puede decirse que en ningún caso el tóxico llega al insecto por una vía inmediata, o, dicho de otro modo, no existe ningún tipo de procedimiento aplicativo cuyo blanco directo sea el insecto a combatir, sino que se utiliza el recurso de esparcir el principio activo en--aquellas zonas particularmente frecuentadas o apetecidas--por aquél, o, lo que viene a ser lo mismo, las zonas a proteger.

Este inconveniente, aparentemente insoslayable, es inherente a las usuales modalidades de aplicación, en las--que, desde luego, no puede pensarse en nada parecido a una agresión concreta o individualizada. Sin embargo, últimamente parecen estar desarrollándose con éxito determinados tipos de metodologías que, basadas en diversos principios operativos como, por ejemplo, la utilización conjunta de--principios activos y sustancias atrayentes de elevada especificidad y amplio radio de acción, logran importantes--reducciones de las áreas afectadas, al mismo tiempo que--una acción más concreta. Naturalmente que la dispersión de

bida a otras causas como los agentes atmosféricos, las cadenas de alimentación, los flujos bióticos, etc., resulta inevitable también de este modo, pero al menos queda restringido de un modo notable el paso inicial, sobre cuya base operan los restantes.

Las etapas subsiguientes vienen dadas por el hecho de que el producto esparcido queda a merced de la acción de toda una compleja serie de mecanismos físicos, químicos y biológicos que, funcionando como efectivas vías de transporte, difunden aquél sobre áreas cada vez más extensas. La magnitud de tal proceso de diseminación depende, en primer término y además de las particularidades del ambiente tratado, tales como su topografía, humedad, radiación solar, regímenes de vientos y lluvias, características biosféricas, etc., de la estabilidad química del compuesto utilizado. Cuando ésta es baja, los mismos mecanismos que actúan como diseminantes pueden contribuir de un modo eficaz a su descomposición, con la consiguiente pérdida de actividad a más o menos corto plazo; pero aquellos productos de elevada estabilidad química son susceptibles de transferirse inalterados, o con modificaciones estructurales tan ligeras que no disminuyen de modo apreciable su actividad biológica, hasta los sustratos más diversos y distantes de su punto de aplicación. Esta es la causa de contaminaciones aparentemente tan insospechadas como la de las faunas polares.

En la figura 2 se ha realizado un esquema que resume las principales rutas de diseminación de los plaguicidas--

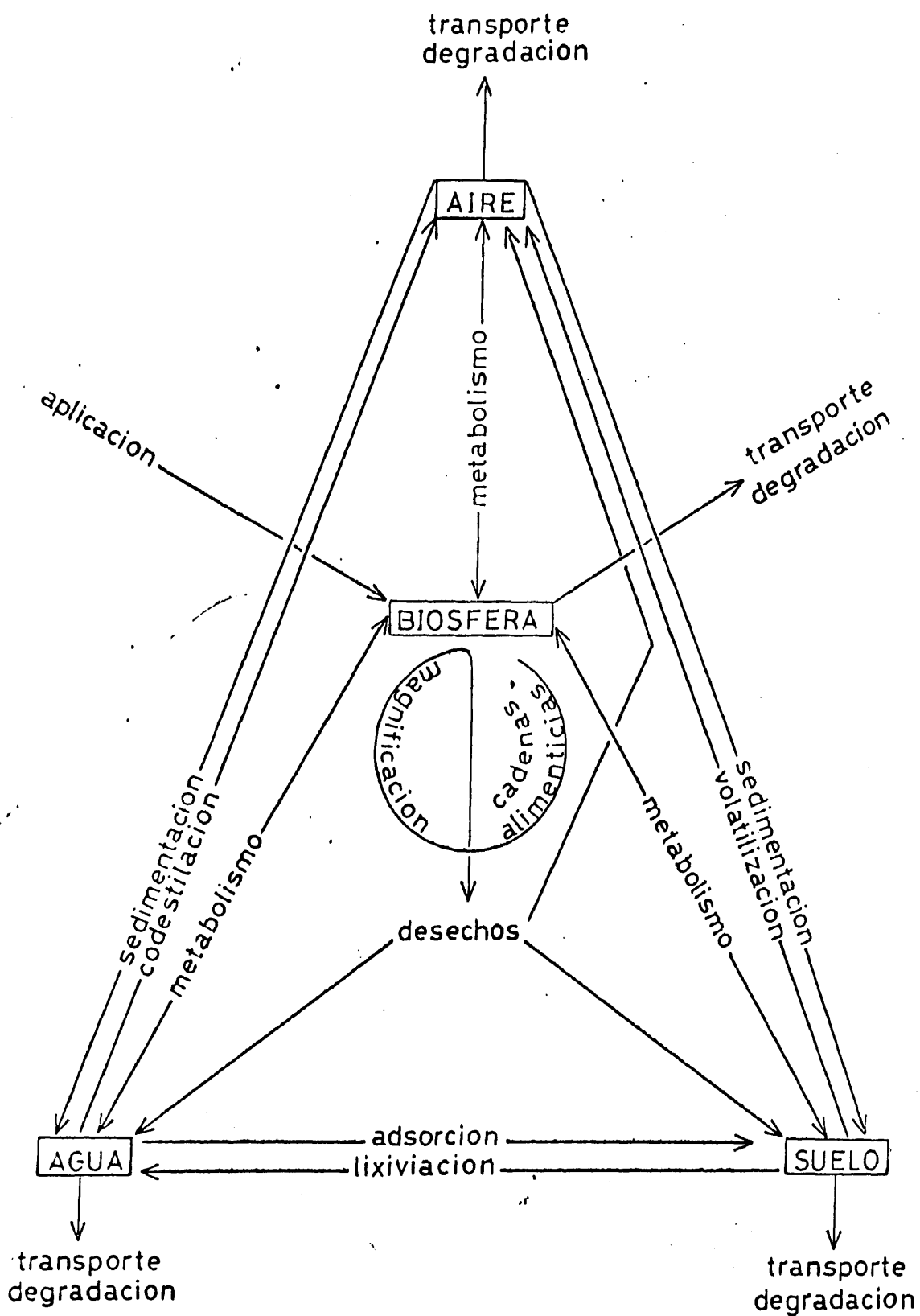


Fig. 2 - Movimiento de los plaguicidas en el medio

en general. La predominancia de los procesos de transporte o degradación, que aparecen como posibilidades simultáneas en varios puntos de dicho esquema, depende precisamente,-- en primer lugar, de la estabilidad química del producto de que se trate.

Pero en relación con este problema, es importante subrayar que se da una acusada ambivalencia en los criterios-- en virtud de los cuales se define la idoneidad de un insecticida: en efecto, desde el punto de vista toxicológico,-- que mira a evitar en lo posible el contacto con ambientes contaminados o la ingestión de alimentos portadores de residuos tóxicos, un principio activo ha de presentar un---- cierto grado de inestabilidad química que favorezca su descomposición cuando sobre él incidan los factores ambientales mencionados más atrás; es decir, debe poseer una vida-residual corta (entendiéndose por vida residual media de un principio activo el tiempo que tarda en descomponerse-- el 50 % de la especie química considerada. Se supone que-- es independiente de la concentración inicial y constituye una característica empírica de dicha especie química sobre cada sustrato).

Por el contrario, considerados con un criterio que,-- aunque de un modo dudoso, podríamos calificar de práctico, interesan fundamentalmente aquellos productos que se caractericen por una acción prolongada, cualidad que es frecuentemente destacada en la propaganda de diversas formulaciones comerciales.

Asimismo conviene mencionar otro aspecto del criterio

práctico, como es el de ofrecer productos de "amplio espectro" y cuya acción, trascendiendo con relativa frecuencia la denominación de insecticida, se hace extensiva a otros grupos de animales superiores, alcanzando, a veces con alta efectividad, hasta a Vertebrados inferiores. No creemos necesario señalar que el objetivo verdaderamente interesante y que, a nivel de investigación se reconoce perseguir, es la puesta a punto de formulaciones o metodologías cuya acción pueda restringirse, a ser posible, hasta el nivel de especie.

Consecuencia directa de estos puntos de vista dudosamente prácticos, ha sido la puesta en circulación de una serie de productos que entran en la categoría de tóxicos acumulativos. Una buena parte de los insecticidas órganoclorados, por ejemplo, se caracteriza por su elevada estabilidad ante ataques de naturaleza física, química y bioquímica, así como por un lento ritmo de eliminación por parte de los seres vivos.

Con estas premisas, resulta obvio que si una determinada especie química es difícilmente degradable y lentamente eliminable por un organismo receptor, la ingestión más o menos continuada de dosis individualmente tan reducidas como para que no se manifieste ni tan sólo el efecto mínimo, podrán conducir a la acumulación del producto hasta niveles que ulteriormente dejarán apreciar su acción.

Diversos insecticidas clorados, por su lipofilia, se acumulan, al ser ingeridos en dosis subletales, en los sis

temas lipídicos del organismo animal, pudiendo permanecer, en ellos inactivos e inalterados durante periodos dilatados de tiempo, siempre que el animal siga una dieta suficiente para cubrir sus necesidades energéticas; pero si--- por cualquier circunstancia pasa por un periodo de hambre, la necesaria movilización de las reservas grasas lleva con sigo la puesta en circulación del tóxico, que, si había al canzado un nivel suficientemente elevado, podrá provocar-- en este momento, actuando "de una vez", una intoxicación-- aguda.

Del mismo modo podrá esperarse, y de hecho se han encontrado numerosas constataciones de tal hipótesis, que a medida que en un ecosistema se ascienden los peldaños de-- una escala trófica hacia la categoría de las formas predadoras, los niveles de residuos experimenten incrementos co rrelativos.

Ultimamente, la validez del calificativo de tóxico--- acumulativo aplicado a los insecticidas clorados, ha sido sometida a crítica por J. Robinson,¹⁰ el cual establece una analogía entre un coeficiente de reparto y la relación entre las concentraciones en estado estacionario de un insec ticida órganoclorado en la sangre y los distintos tejidos, y sostiene que el ritmo de eliminación de un insecticida-- por un tejido está en función de su concentración en éste, presentando el proceso, al menos en determinados casos, ca racterísticas de reacción unimolecular. En estas condiciones, si la entrada de insecticida es uniforme, la relación entre su concentración en el tejido y el tiempo de exposi-

ción puede ser de tipo asintótico y el proceso acumulativo, en su forma más simple, vendrá definido por la expresión:

$$\frac{dc}{dt} = a - Kc$$

En la que a representa la entrada de insecticida y es función del nivel de ingestión del mismo por el organismo considerado, c su concentración en el tejido a un tiempo t y K una constante de proporcionalidad para el proceso de eliminación. Los valores de a y K son característicos de cada insecticida frente a cada organismo.

Sin embargo, y pese a que parece ser que, en experiencias de laboratorio, los valbres de la concentración no sólo no sobrepasan un cierto límite, sino que a partir de un máximo comienzan a declinar (hecho que Robinson considera plausible atribuir a fenómenos de estimulación de la actividad enzimática), los estudios efectuados sobre poblaciones naturales señalan de modo aparentemente inequívoco la peligrosidad de diversos insecticidas clorados, sugiriendo, al menos para los componentes de las poblaciones estudiadas, elevadas relaciones a/K , o bien efectos perniciosos a plazo medio y largo de concentraciones incluso situadas por debajo del nivel asintótico.

No obstante, diversos autores aceptan con ciertas reservas el rigor de la anterior u otras consideraciones o modelos contruídos sobre una base casi puramente matemática, desprovista del apoyo experimental y que no tiene en cuenta un gran número de factores circunstanciales que pue

den afectar intensamente la cinética de los residuos en---
los seres vivos.

Dale et al.¹¹, por ejemplo, encontraron que la cantidad total de alimento ingerido alteraba las proporciones de---
DDT excretado por la rata. Estudios experimentales de Andrews et al.¹² sobre los efectos del heptacloro en *Lepomis macrochirus*, pusieron de manifiesto que la mera simulación de eventualidades simples que se producen continuamente en ambientes naturales, es capaz de determinar dinámicas residuales imprevisibles. L. Stickel¹³ sostiene que numerosas incidencias de muy diversa índole, como las movilizaciones--
estacionales de grasas, el crecimiento, las enfermedades,--
la reproducción, el estado psíquico y otros factores de naturaleza abiótica (entre los que debe de contarse el he--
cho de que ni la exposición al tóxico acostumbra a ser uniforme o continua, ni dicho tóxico se encuentra aislado),--
son siempre, en condiciones naturales, responsables de una larga serie de efectos no susceptibles de ser especifica--
dos "a priori" mediante consideraciones de índole teórica.

Efectivamente, J. A. Keith¹⁴, trabajando en el lago Hurón sobre colonias de gaviota argentea (*Larus argentatus*) obtiene resultados que pueden resumirse en los siguientes--
datos: el análisis de 9 huevos aparentemente vivos, reveló un contenido, referido a su peso fresco, de 13, 202 y 6---
ppm de DDT, DDE y TDE respectivamente. En el año 1963, el--
contenido total de los tres productos fue de 127 ± 13 ppm, frente a 227 ± 38 ppm encontradas en 1964. Por otra parte, en el análisis de 10 huevos estériles se halló un total de

1027 \pm 127 ppm para los tres insecticidas.

Al realizar un estudio de la población, se observó que en un total de 115 nidos existían huevos estériles en una proporción del 30 al 35 % y que en los pollos se registraba una mortalidad excepcionalmente elevada antes de la adquisición del plumaje de adulto. El análisis de 3 pollos-- de una semana puso de manifiesto contaminaciones que oscilaban entre 35 - 48, 308 - 365 y 10 - 16 ppm de DDT, DDE y TDE. En 5 pollos de 6 semanas que fueron sometidos a análisis individuales de tejidos para el total de los tres productos, se encontraron 1,9 ppm en el cerebro, 7 ppm en la musculatura de vuelo y 180 ppm en los tejidos grasos. Por último, la proporción registrada de pollos por pareja adulta fue de 0,3 a 0,4 entre la población de los 115 nidos--- que se controlaron.

J. O. Keith¹⁵ investigó durante los años 1960 - 62 las causas de la mortalidad entre las aves piscívoras del lago de Tule (California), demostrando que más de 1100 individuos pertenecientes a 10 diferentes especies, habían muerto a causa del toxafeno que se había utilizado en el periodo 1958 - 60 en terrenos de labor vecinos y que, arrastrado por aguas de lluvia y riego, se había acumulado en los peces. Asimismo se detectaron elevadas proporciones de compuestos del grupo del DDT que ya se habían acumulado hasta alcanzar niveles muy posiblemente peligrosos.

Durante el transcurso de este estudio se observó que, si bien las concentraciones de DDT en las muestras de agua

no alcanzaban valores sustancialmente altos, estas concentraciones se multiplicaban por factores de hasta 2.10^4 en el sedimento que se obtenía por filtración de las mencionadas muestras y que, constituido por materia en suspensión de naturaleza fundamentalmente orgánica, sirve de base alimenticia a numerosas formas inferiores de vida, iniciándose de este modo la secuencia de transporte a través de las cadenas de alimentación. Por otra parte, se encontró que, en suelos abundantes en Invertebrados, los residuos de DDT eran bajos en los sedimentos y elevados en los peces, mientras que en suelos con escasa población de aquéllos, los vegetales presentaban los niveles máximos. Tales resultados confirman la importancia del papel de la materia orgánica en suspensión y sus interacciones con los Invertebrados en los medios acuáticos.

Otra observación ilustrativa fue efectuada en el litoral de Connecticut, al registrarse en un año un descenso de un 30 % en la población de *Pandion haliaëtus* (águila pescadora), dándose proporciones que se acercaban al 50 % de huevos estériles en los que, por otra parte, fueron hallados residuos de DDT a concentraciones de 0,35 mg por huevo.

En una línea de investigación paralela, experimentando con 223 huevos de codorniz, 190 de gallina y 20 de faisán, Y. Lutz-Ostertag y H. Lutz encontraron graves alteraciones en el aparato reproductor¹⁶ en proporciones de hasta el 90 % de los embriones supervivientes (un 34 % moría en estadios precoces de desarrollo), cuando los huevos se---

trataban con aldrín puro administrado en dosis de 50 a 200 ug por huevo. Las reacciones observadas sobre el tracto genital de los embriones de gallina y faisán señalan un fenómeno de pseudocastración parcial: reducción del tamaño de los testículos y perturbaciones hormonales cuyo resultado es el anormal mantenimiento de los canales de Müller que, normalmente, sufren una involución y acaban por desaparecer. En el caso de la codorniz, el efecto parece ser más bien de tipo oestrogénico, que inhibe la hormona masculina embrionaria y produce un engrosamiento del epitelio germinativo testicular, manteniendo asimismo los canales de Müller.

Como fácilmente puede apreciarse, las discrepancias-- en las interpretaciones de los resultados obtenidos con modelos más o menos teóricos frente a las condiciones naturales, constituyen uno de los enojosos puntos de controversia que hemos tenido ocasión de aludir en las primeras páginas.

3.2 - CONSIDERACIONES CRITICAS SOBRE LA DEGRADACION DE LOS INSECTICIDAS.

Teniendo en cuenta las características de la situación actual, que se ha tratado de centrar a través de los apartados anteriores, en torno a la problemática de la repercusión de los insecticidas a nivel ecológico, es comprensible que en los últimos años se haya suscitado un creciente interés por los estudios relacionados con su degradación.

En la tabla V se recogen una serie de datos referentes a este aspecto, para algunos productos de utilización corriente, y un examen de la misma revela que los tiempos que deben transcurrir para que tenga lugar la desaparición del 95 % del principio activo en los sustratos naturales sobre los que normalmente se aplica, aun oscilando entre límites muy amplios, permiten considerar, a grandes rasgos, dos categorías de compuestos que a su vez se encuentran en estrecha concordancia con las que se establecen cuando se sigue el criterio químico: compuestos que desaparecen en tiempos del orden de días (órganofosforados y carbamatos) y compuestos cuya vida es de años (órganoclorados).

Así pues, considerada la situación bajo este enfoque, puede quizá decirse que son exclusivamente los insecticidas órganoclorados aquéllos susceptibles de plantear problemas de contaminación residual capaces de incidir de un-

TABLA V - Permanencia de algunos insecticidas.

Plaguicida	Dosis aplicada (Kg/Ha)	Tiempo necesario para que desaparezca el 95 %
Malation	5,5	5-8 días
Metilparation	5,5	15-20 "
Gution	5,5	25-35 "
Timet	5,5	50-60 "
Paration	5,5	75-85 "
Sevín	5,5	50-60 "
Aldrín	1,13-3,36	1-6 años
Telodrin	0,28-1,13	2-7 "
Heptacloro	1,13-3,36	3-5 "
Clordano	1,13-2,23	3-5 "
Lindano	1,13-2,77	3-10 "
Dieldrin	1,13-3,36	5-25 "
DDT	1,13-2,77	4-30 "

modo solapado sobre el equilibrio de las poblaciones naturales. Las aplicaciones de insecticidas órganofosforados, - que a veces presentan inconvenientes derivados de elevadas toxicidades agudas y necesidad de manipulaciones delicadas, y de carbamatos, podrán ejercer acciones no deseables a--- plazos cortos, lo cual facilita su control, pero no pare-- cen poder proyectar implicaciones complejas e inesperadas- que acarreen procesos irreversibles a largo plazo. Señala- remos de nuevo, en este punto, que la sencillez de la mani- pulación que exigen y su bajo costo, son los factores que, añadidos precisamente a lo duradero de su actividad, más-- han contribuido a extender el empleo de los compuestos ór- ganoclorados, siendo en la actualidad difícil, por numero- sas razones de diversa índole, su más o menos rápida su--- plantación.

Antes se había mencionado que la naturaleza de los mecanismos que contribuyen a la descomposición o desactivación de los insecticidas puede ser física, química y biológica. Entre los factores de orden físico deben contarse como fundamentales la temperatura y la radiación solar. Por lo que respecta a la temperatura, sus efectos son muy poco o nada significativos en el medio ambiente, pues si bien se habla en ocasiones de la termolabilidad de determinados insecticidas clorados, como el endrín, las descomposiciones térmicas que se aluden tienen lugar en condiciones muy drásticas (temperaturas de alrededor de 200° C y a veces catálisis por metales), que no es concebible que concuerran en ambientes naturales.

Es posible que no ocurra lo mismo con la acción de la radiación solar, ya que se ha encontrado que varios compuestos ciclodiénicos experimentan rápidas transformaciones cuando se exponen a la luz ultravioleta y parece ser que un fotoisómero del dieldrín se produce por efecto de la luz solar en el suelo y las hojas de algunos vegetales, si bien las proporciones del mismo halladas en alimentos fueron muy bajas.

Las acciones de orden químico consisten esencialmente en oxidaciones, hidrólisis, descarboxilaciones, desclorhidraciones, isomerizaciones, de las que, en términos generales, puede decirse que necesitan de condiciones relativamente enérgicas para producirse. Son bien conocidas desde hace tiempo las desclorhidraciones del DDT en medio alcalino y del lindano, así como las epoxidaciones de aldrín,---

isodrín y heptacloro, para no citar más que los ejemplos-- de mayor significación, pero de nuevo hay que hacer notar-- que, en un ambiente natural, las contribuciones de fenóme-- nos puramente químicos a este tipo de transformaciones no-- parece revestir demasiada importancia desde un punto de--- vista cuantitativo.

Son con seguridad los mecanismos de índole bioquímica aquellos que en mayor medida contribuyen a las transforma-- ciones que experimentan los insecticidas en el medio am--- biente y, aunque con frecuencia muchos de los productos re-- sultantes coinciden con los que derivan de fenómenos físi-- cos o químicos naturales, en general ocurre que los ata--- ques que tienen lugar a través de los procesos metabólicos de los seres vivos son más rápidos (como corresponde a--- reacciones con catálisis enzimática), exhiben un espectro más amplio de variaciones químicas y en ocasiones a moléculas verdaderamente degradadas.

Sin embargo, en la abundante bibliografía que en la-- actualidad existe disponible sobre el tema, es fácil obser-- var que en el estudio de la interacción ser vivo - insecti-- cida, se dedica relativamente mucha más atención a los fe-- nómenos que inciden sobre este último que a los que atañen al primero como resultado de su propia acción; cuando, de-- hecho, es plausible esperar que la inclusión de un metabo-- lito extraño, como lo puede ser una molécula fuertemente-- clorada, en el complejo contexto bioquímico que sostiene-- la vida, provoque en éste desplazamientos susceptibles de-- ser evaluados por sus productos finales. En efecto, si se-

utiliza como instrumento analítico la cromatografía de gas-líquido, aun en una modalidad de detección de elevada selectividad como la captura electrónica, resulta frecuente la constatación, incluso sin que el hecho se haya previamente marcado como un objetivo definido y específico, que los extractos biológicos de los organismos que han interactuado con un insecticida, difieren de los correspondientes controles, unas veces por exceso y otras por defecto--de uno o más componentes detectables. A tal hecho, que a lo largo del desarrollo de la parte experimental de esta memoria, se ha podido comprobar en numerosas ocasiones---cuando se trabajaba con extractos sólo parcialmente purificados y que aun se mantenía en algunos sometidos a purificaciones enérgicas, únicamente le ha concedido importancia, de entre gran número de publicaciones consultadas, un solo grupo de investigación.

Por otra parte, existe todavía un aspecto que merece ser comentado aquí y tal es la validez del concepto de degradación aplicado a los insecticidas órganoclorados, así como las consecuencias reales que comportan sus transformaciones. En realidad, en la gran mayoría de los casos, el término de degradación en un sentido estricto, entendido como un proceso en virtud del cual un compuesto orgánico--queda disminuído en su número de átomos de carbono, resulta incorrecto en este contexto particular, ya que por ninguno de los mecanismos citados se suelen conseguir más que ligeras transformaciones químicas que afectan a la molécula sólo de un modo muy restringido o localizado y que, desde luego, no sustraen en absoluto eslabones a su esqueleto

carbonado.

Naturalmente que puede objetarse que aun alteraciones muy superficiales desde un punto de vista puramente químico, llevan, en ocasiones, consigo cambios básicos por lo que a la actividad biológica se refiere. Ello es cierto y se conocen numerosos ejemplos reales en los que ocurre así, con el resultado de un descenso en la toxicidad, pero, como contrapartida, también se dan casos en los que la alteración hace aparecer propiedades indeseables: el aldrín es epoxidado fácilmente y convertido en dieldrín como consecuencia del metabolismo de muchos seres vivos, pero este epóxido, aunque de toxicidad ligeramente inferior a la del aldrín para los animales superiores, presenta el inconveniente de ser bastante más estable, hecho que facilita su acumulación. El dieldrín puede a su vez experimentar una fotoisomerización inducida por la fracción UV de la radiación solar, pero el fotoisómero resulta más tóxico para varios animales superiores.

En último término, en el más favorable de los casos, el hecho innegable consiste en que el resultado final ha sido la puesta en circulación a lo largo de los ciclos naturales de la materia, de un producto de características xenobióticas: un hidrocarburo con elevado contenido en cloro (las partes cloradas de las moléculas de los insecticidas son precisamente las más invulnerables), de gran estabilidad y, por tanto, susceptible de acumularse en cualquier compartimento de la Naturaleza, hecho cuyo alcance, también en el mejor de los casos, se ignora.

3.3 - LAS TRANSFORMACIONES DE LOS INSECTICIDAS CICLODIENICOS EN RELACION CON SU TOXICIDAD.

Los insecticidas ciclodienicos, cuyo ejemplo más característico es el aldrín (1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahidro-1,4-endo,exo-5,8-dimetanonaftaleno) y entre los que se cuentan, además de éste, el isodrín, dieldrín, endrín, heptacloro, clordano y toxafeno, constituyen uno de los grupos de compuestos órganoclorados que exhiben un más alto grado de estabilidad, al menos ante acciones-- de naturaleza física y química.

Su utilización, que en los E.E.U.U. era ligeramente-- inferior a la del DDT hasta finales de la década del 50,-- se elevó desde principios de la del 60, probablemente en-- gran parte debido a la campaña de prensa que aproximadamen-- te por estas fechas se desarrolló en contra del DDT, lle-- gando ya, en el 64 - 65, a casi duplicar el consumo de es-- te último. No resulta fácil obtener datos suficientemente-- fidedignos sobre el consumo en otros países, pero parece-- muy probable que el fenómeno registrado en los E.E.U.U. se haya producido, a mayor o menor escala, en todo el mundo.

Tales circunstancias han determinado que este grupo-- de insecticidas órganoclorados haya resultado favorecido,-- en los últimos tiempos, por lo que se refiere al número de estudios que se han ocupado de investigar sus posibilida--

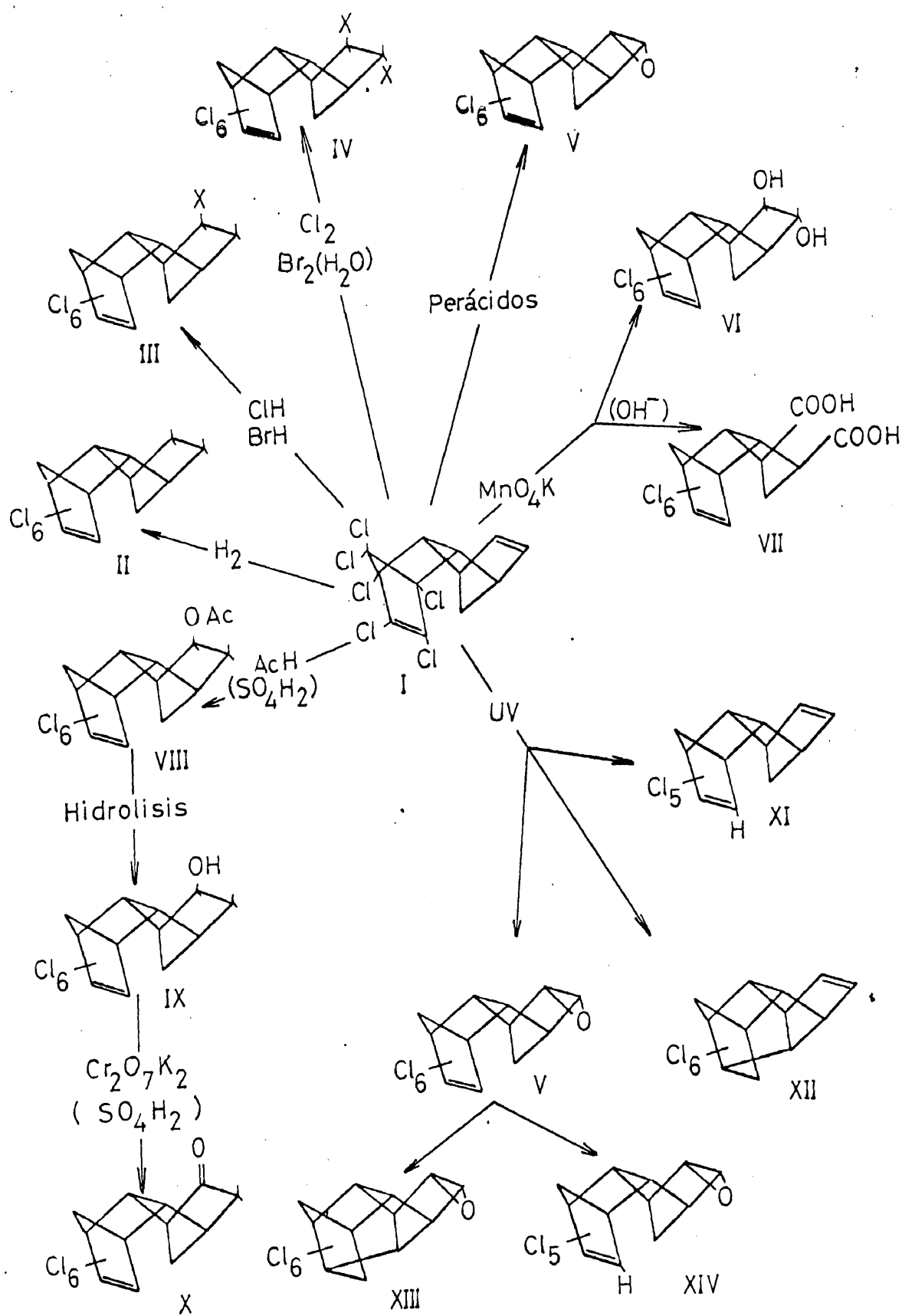


Fig. 3 - Principales derivados del aldrín.

des de transformación y, en particular, su metabolismo por animales superiores.

Dichos estudios, al menos cuando su objetivo es la localización de procesos naturales de transformación, resultan en cierto grado problemáticos teniendo en cuenta, precisamente, la baja reactividad de los insectici-

das ciclodiénicos, los cuales constituyen un ejemplo altamente ilustrativo de compuestos que, una vez incluidos en los ciclos de la materia en la Naturaleza, son susceptibles de experimentar únicamente transformaciones químicas triviales, aunque en condiciones de laboratorio se haya logrado una considerable cantidad de derivados. En la figura 3 se esquematizan los procesos que dan lugar a algunos de los productos de transformación sencillos del aldrín, varios de los cuales se han encontrado también como resultado de acciones naturales.

No obstante, es difícil predecir el valor biológico de una determinada estructura, por muy similar que ésta sea a otra de actividad conocida, si no se conoce asimismo con cierta precisión el mecanismo bioquímico por el que la segunda ejerce su efecto, y como Soloway ha demostrado en un perfectamente documentado trabajo⁶, basado en datos obte-

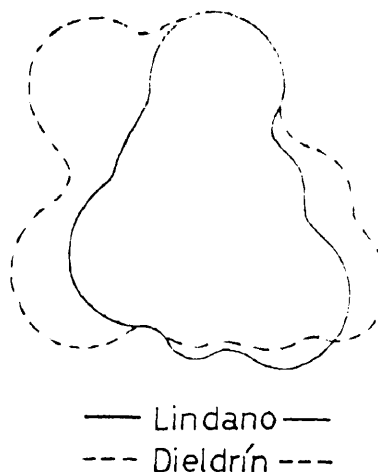


Fig. 4 - Perfiles estructurales de lindano y dieldrín.
(Según Soloway).

nidos después de haber ensayado alrededor de 500 compues--
tos derivados de las estructuras fundamentales implicadas--
en los insecticidas ciclodiénicos, leves modificaciones---
pueden ser suficientes para inducir profundos cambios de--
comportamiento bioquímico que incidan de modo positivo o--
negativo sobre la toxicidad.

Como ya se comentó anteriormente, el mecanismo de ac--
ción de los insecticidas clorados en general no se conoce--
con la suficiente finura, y si bien su toxicidad se atribuye
a su efecto convulsionante sobre el sistema nervioso---
central, se ignora la entidad afectada a nivel bioquímico.
L. J. Mullins, en un trabajo ya citado,⁵ asigna a la membra
na de las células nerviosas una estructura fundamentada en
macromoléculas lipoproteicas circulares cuya yuxtaposición
permite la existencia de espacios intersticiales o poros,-
en los cuales pueden encajar exactamente moléculas como la
del lindano o la del DDT, provocando de este modo la ac---
ción convulsionante, mientras que otras estructuras, aun--
isoméricas o muy análogas, al no ajustarse con suficiente-
precisión al poro, no exhiben tal actividad.

Soloway critica a esta hipótesis el hecho de no po---
seer capacidad para explicar las diferencias entre los mo--
dos de acción de lindano y DDT: efectivamente, en el pri--
mero los síntomas de la intoxicación en la mosca doméstica
consisten en una falta de coordinación en los movimientos--
de las alas y, al igual que el aldrín y dieldrín y contra--
riamente a lo que sucede con el DDT, el lindano no provoca
alteraciones en los órganos sensoriales, mientras que el--

envenenamiento por DDT se manifiesta por continuas y progresivas disfunciones coordinativas que no tienen por qué afectar de un modo inmediato a la capacidad de vuelo.

La similitud en los síntomas de intoxicación y en los perfiles estructurales (véase la figura 4), así como el fenómeno de resistencia cruzada que se da entre el lindano

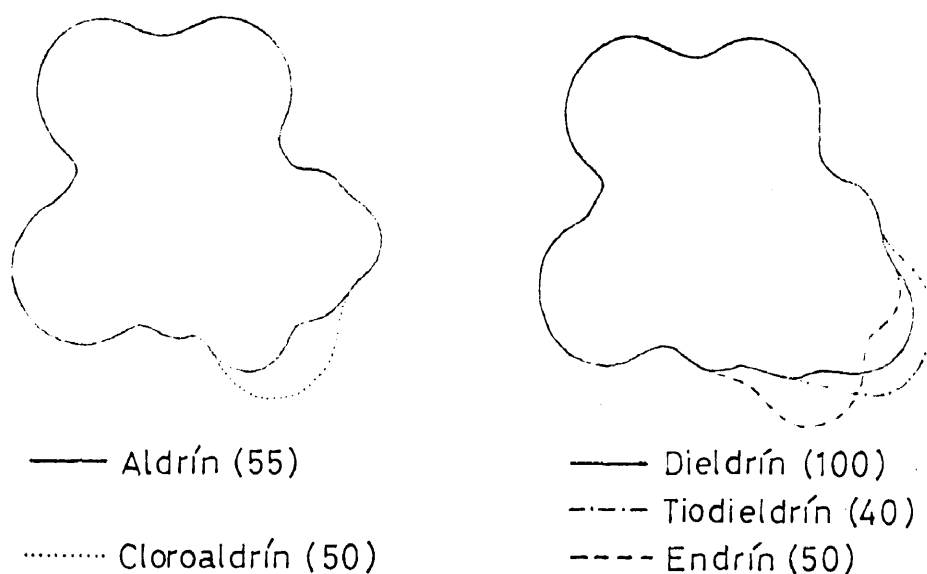
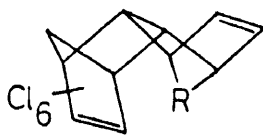
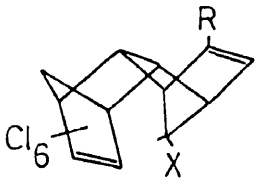
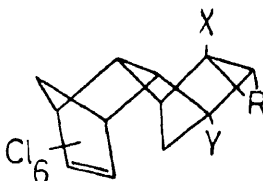
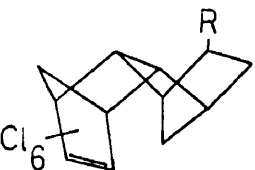
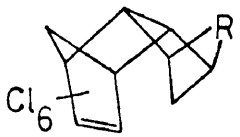


Fig. 5 - Perfiles de algunos insecticidas ciclodiénicos y análogos estructurales. Los números entre paréntesis indican su toxicidad para *Musca domestica*, sobre la base de una toxicidad de 100 para el dieldrín. (Según Soloway).

y el dieldrín, sugieren, para Soloway, la identidad de su lugar biológico de acción, y sobre la base de un elevado número de correlaciones estructura química - actividad biológica obtenidas con análogos de hexaclorohexahidrodimetanonaftaleno, algunas de las más significativas de las cuales figuran en la tabla VI, deduce que en los insecticidas ciclodiénicos y el lindano la toxicidad debe de relacionar

TABLA VI- Toxicidad de algunos análogos de hexaclorohexahidrodimetanonaftaleno. (Según Soloway).

		Toxicidad para Musca domestica (dieldrín 100)
	R: CH ₂	55
	R: C=C-(CH ₃) ₂	0
	R: CH ₃ ; X: H	0
	R: Cl; X: H	8
	R: H; X: Cl	50
	R: H; X: O-C-(CH ₃) ₃	0
	R: O; X: H; Y: H	100
	R: S; X: H; Y: H	40
	R: S→O; X: H; Y: H	50
	R: O; X: CH ₃ ; Y: H	0
	R: O; X: H; Y: CH ₃	10
	R: H	9
	R: I	30
	R: CH ₂ Cl	10
	R: N=N	360
	R: N=N→O	445

se con la existencia en su molécula de dos centros activos ricos en electrones, siendo precisa una interacción conjunta de ambos con alguna entidad biológica, que continúa sin ser especificada de un modo concreto e inequívoco, para--- que se ejerza un efecto tóxico intenso.

Cuando entre ambos centros concurren determinados parámetros referentes a la distancia, orientación, configuración, tamaño y electronegatividad de los mismos, se producirá el efecto máximo, mientras que en aquellos otros casos en que tenga existencia solamente uno de los puntos activos, la toxicidad, al menos por lo que se refiere a los Insectos, será baja.

Por otra parte, y puesto que en numerosos casos tales puntos ricos en electrones no pueden ser considerados como activos desde un punto de vista estrictamente químico, deberá suponerse que constituyen lugares en donde acontecen interacciones de orden físico, con toda probabilidad de naturaleza electrostática.

En efecto, dentro de los derivados ciclodiénicos, la actividad más intensa se manifiesta en aquellas estructuras que, además de la parte policlorada, contienen algún--- otro centro de carácter electronegativo, que puede estar--- representado por un doble enlace o átomos tales como cloro, oxígeno, azufre o nitrógeno. Y de hecho, pese a que desde un punto de vista puramente geométrico es fácilmente destacable la neta predominancia de la fracción de hexacloro-

norborneno (que constituiría el primer centro activo),-- cuando se comparan perfiles moleculares de diversos análogos estructurales de hexaclorohexahidrodimetanonaftaleno-- (figura 5), las variaciones en la toxicidad de tales análogos ponen de relieve la repercusión en la misma de la actuación del segundo centro activo.

3.4 - LA SIGNIFICACION DEL ALDRIN COMO ESTRUCTURA SUSCEPTIBLE DE TRANSFORMACION EN EL MEDIO AMBIENTE.

La discusión de los dos últimos apartados pone de manifiesto el interés, así como la necesidad, de un conocimiento detallado de las transformaciones que experimentan los insecticidas órganoclorados, en especial los de elevada estabilidad química, bien ejemplificados por el grupo de los ciclodiénicos, como consecuencia de las acciones metabólicas de los seres vivos. Por otra parte, es claro que tal conocimiento no debe limitarse a la determinación de las estructuras de los productos resultantes y a una evaluación de su toxicidad, aspectos que, si bien fundamentales, deben de ser complementados por todo tipo de datos referentes a las rutas metabólicas seguidas, mecanismos bioquímicos naturales sobre los que inciden, factores susceptibles de modificar de alguna forma los procesos de transformación y repercusiones de los mismos sobre los seres vivos que los llevan a cabo.

Existen diversas recopilaciones bien documentadas sobre el tema, debiendo citarse, entre otras, las de Porter¹⁷ y Brooks¹⁸, si bien ambas adolecen de ciertos datos de interés obtenidos en investigaciones recientes.

Concretándonos al aldrín y dieldrín, de los que especialmente se ocupa la parte experimental de esta memoria,-

en la actualidad la situación se encuentra, por lo que respecta a los metabolitos de estructura conocida, en el estado que se resume en la figura 6, realizada a partir de las conclusiones de varios autores.

Los resultados de un elevado número de experiencias-- indican que la biotransformación más generalizada del aldrín (I) es su epoxidación a dieldrín (II), proceso conocido desde hace tiempo y cuyo resultado es un aumento de la estabilidad química, una elevación de la toxicidad para los Insectos y una disminución de la misma para los animales superiores. Las características de tal epoxidación, que tiene lugar rápidamente en numerosos seres vivos y es independiente de la vía de penetración, determinó que se haya concedido relativamente más importancia en los últimos tiempos a las ulteriores transformaciones del dieldrín que a otros posibles cambios inducidos en la estructura del aldrín.

Parece ser, en efecto, que, salvo en el caso de ciertos microorganismos, todas las transformaciones que experimenta el aldrín comienzan por la etapa común de la epoxidación y sólo después de ésta tiene lugar la ramificación del proceso.

Las ulteriores rutas metabólicas del dieldrín en la rata fueron aclaradas por Matthews y Matsumura¹⁹ en 1969, y se esquematizan en la parte superior de la figura 6. Es posible que, al menos en parte, puedan generalizarse a otros Mamíferos, ya que algunos de estos metabolitos fueron asi-

mismo detectados en oveja y conejo. La estructura del compuesto IV, conocido como "metabolito de Klein", ya había sido elucidada por Damico et al.²⁰ en 1968 y, en el mismo año, las estructuras IV y VIa fueron descritas por Richardson et al.²¹ como metabolitos urinario y fecal respectivamente del dieldrín en la rata. Probablemente la forma cetónica IV coincida con un metabolito mayoritario, inestable en medio alcalino, que había sido anteriormente detectado, pero no identificado, en orina de ratas sometidas a dietas dosificadas con aldrín o con dieldrín indistintamente, por Heath y Vandekar²² (1964), Ludwig et al.²³ (1964) y Datta et al.²⁴ (1965).

El compuesto V presenta un considerable grado de hidrofilia debido a la presencia del ácido glucurónico como conjugante, lo cual impide su extracción a partir de medios acuosos, como la orina en la cual se detecta, mediante los procedimientos convencionales de reparto con los disolventes orgánicos usuales tales como éter, benceno, cloroformo, cloruro de metileno, ensayados aisladamente o en mezcla (cloroformo - metanol, benceno - metanol, etc.). Este metabolito constituye una de las dos posibilidades conocidas de transformación de la estructura alcohólica III, siendo el otro camino una ulterior oxidación de la función alcohol a cetona, para dar el metabolito de Klein.

25,26

En 1970, Hedde et al., estudiando el metabolismo del dieldrín en la oveja, detectan el trans - dihidroxi dihidro aldrín (VII) y otro compuesto que tratan como idéntico al-

fecal de la rata, pero para el cual no aceptan la estructura VIa, proponiendo la de alcohol secundario VIb, que Robinson, en una comunicación posterior,²⁷ acepta. Mencionan, asimismo, la existencia de metabolitos hidrofílicos a los que asignan, de modo provisional, estructuras conjugadas:-- para uno de ellos entre el trans -diol VII y el ácido glucurónico, e interviniendo en otro el mismo ácido glucurónico y posiblemente glicocola.

En experiencias realizadas con anterioridad por Korte y Arent²⁸ (1965) sobre el conejo, que parece ser de los Mamíferos capaces de una más enérgica acción sobre los insecticidas ciclodiénicos (Brooks¹⁸), después de la administración a través de tubo gástrico de un total de un 56 a 68--mg/Kg de dieldrín - C¹⁴ durante un periodo de 21 semanas,-- el animal había excretado, fundamentalmente en la orina,-- el 42 % de la radiactividad total en forma de seis metabolitos, uno de los cuales representaba el 86 % de la radiactividad eliminada y que resultó ser el diol VII.

La administración intravenosa de aldrín - C¹⁴ (Korte y Kochen,²⁹ 1966) condujo a análogos resultados, con la detección de dieldrín, el diol VII (también en proporciones mayoritarias), dos componentes minoritarios que en el infrarrojo daban bandas carbonílicas y eran convertibles en la forma VII por hidrólisis, en razón de lo cual fueron--- considerados como probables mono y diacil derivados del--- diol, una cetona isomérica del dieldrín, pero cuya estructura no fue determinada y un segundo diol al que tampoco-- se atribuyó estructura, pero que en el IR no daba la banda

a 1600 cm^{-1} , característica del doble enlace clorado presente en los insecticidas ciclodiénicos.

En términos generales, las investigaciones sobre el metabolismo de aldrín y dieldrín por el conejo demuestran que en el caso del primer compuesto se produce un metabolito más que en el del segundo, lo cual sugiere que dicho compuesto adicional deriva directamente del aldrín, constituyendo la única evidencia, en animales superiores, de una vía metabólica de este insecticida diferente de aquellas cuyo primer paso consiste en su transformación a dieldrín.

Existe, comparativamente, una información bibliográfica bastante más escasa relativa a las transformaciones de los insecticidas ciclodiénicos en organismos diferentes de los Mamíferos, aunque determinados hechos de carácter general, como la posibilidad de conversión de aldrín en dieldrín, han sido bien establecidos, según se dijo antes, en gran número de seres vivos.

Operando con fracciones de raíz de judía, recientemente se ha podido comprobar (Yu et al.³⁰, 1971) la implicación de dos diferentes sistemas enzimáticos en el metabolismo del aldrín por este vegetal: uno de ellos lleva a cabo su epoxidación a dieldrín y el otro lo transforma en el diol VII de un modo directo, sin que medie el epóxido como metabolito precursor.

En un estudio en el que se examina el resultado de---

las transformaciones del aldrín en suelos de pradera durante un periodo de diez años, Lichtenstein et al.³¹ (1970), detectan aldrín intransformado, dieldrín, dihidroxidihidroaldrín, dicarboxialdrín (VIII), fotoaldrín y fotodieldrín--- (compuestos XII y XIII de la figura 3). Los productos--- atribuibles a la actividad biológica del suelo, recogidos en la parte inferior de la figura 6, son únicamente los II, VII y VIII, y de ellos sólo el último era realmente desconocido como producto de biotransformación del aldrín. Sin embargo, la reaparición de los fotoisómeros como resultado de un proceso natural (ya Roburn³² en 1963 había hallado fotodieldrín en follajes que habían sido pulverizados con--- dieldrín), señala la conveniencia de su estudio en función de su posible incorporación a las cadenas alimenticias, puesto que, por otra parte, el correspondiente al--- dieldrín exhibe una mayor toxicidad que éste para diversos animales superiores.

Pese a que, en opinión de Robinson con respecto al fotodieldrín, las circunstancias de su formación y las bajas tasas del mismo halladas en alimentos³³ sugieren que el proceso de fotoisomerización no debe representar un incremento en el significado toxicológico de los residuos de dieldrín,³⁴ ya se han llevado a cabo trabajos con la orientación que se acaba de mencionar, y el mismo Robinson,³⁵ además de Klein et al.³⁶, han estudiado los productos de transformación del fotodieldrín como resultado de su metabolismo por la rata.

Este segundo grupo de investigadores encuentra que,--

alimentando a ratas con dietas dosificadas con fotodiel---
drín - C^{14} a niveles subagudos, alrededor del 30 % de este
compuesto es excretado por los machos en forma de metabolil
tos urinarios. Un 85 % de la radiactividad así eliminada--
es susceptible de extracción con disolventes orgánicos y--
aproximadamente el 85 % del extracto es cetodieldrín (IV).
En el caso de las hembras, la resolución de la identidad--
de los metabolitos urinarios es más complicada. Sólo un---
50 % de la radiactividad así eliminada puede extraerse con
éter, repartiéndose esta cantidad en cuatro compuestos cu-
ya elevada polaridad dificulta su aislamiento por los pro-
cedimientos usuales de cromatografía en columna de Flori--
sil. Análogas dificultades surgen cuando el extracto se---
examina por cromatografía de gas - líquido, ya que los----
tiempos de retención son del orden de una semana. No se co
nocen todavía datos concretos sobre el otro 50 % de la ra-
diactividad, que se encuentra en forma hidrosoluble.

3.5 - EL METABOLISMO DE ALDRIN Y DIELDRIN POR MICRO-ORGANISMOS.

Como, entre otros investigadores, subraya Brooks,¹⁸ es evidente que toda información concerniente al significado de los microorganismos en las transformaciones de los insecticidas ciclodiénicos, resulta siempre de gran interés, dado lo fundamental del papel que desempeñan tales formas de vida en la dinámica de los suelos y su frecuente asociación con organismos superiores.

La epoxidación del aldrín en el suelo constituye un fenómeno bien conocido desde 1958,³⁷ y la responsabilidad de los microorganismos edáficos en este proceso fue probada en 1960 por Lichtenstein y Schultz,³⁸ quienes encontraron que la transformación decaía considerablemente en suelos sometidos a esterilización en autoclave. Asimismo, la adición de Sesamex (Lichtenstein et al.,³⁹ 1963), que reduce la población microbiana en cultivos puros, suspensiones de suelos y suelos completos, inhibe en estos últimos la producción de dieldrín a partir de aldrín.

No obstante, por lo que respecta a las ulteriores transformaciones del dieldrín o a la posibilidad de otras rutas paralelas del aldrín diferentes de la que comienza por la epoxidación, los datos conocidos hasta el momento no permiten extraer todavía conclusiones suficientemente

definitivas ni en lo referente a la importancia cualitativa y cuantitativa de tales rutas así como los factores que las afectan, ni a la elucidación estructural de diversos-- metabolitos que, detectados en ciertos casos, no han podido ser identificados. En las investigaciones llevadas a cabo unas veces con suelos completos, suplementados o no con materia orgánica adicional, y otras con cultivos puros de diversas especies de microorganismos edáficos, se obtiene una diversidad de resultados que sugiere no sólo comportamientos característicos dependientes de la posición sistemática de los microorganismos objeto de ensayo, sino también variaciones determinadas por las condiciones de experimentación.

Lichtenstein et al., en una publicación ya citada,³¹--- mencionan la aparición, en suelos tratados con aldrín, de los metabolitos VII y VIII (figura 6) que, además del--- dieldrín, deben atribuirse a la actividad microbiana; pero no existen evidencias que permitan especificar sin ningún género de dudas su procedencia: el diol VII puede derivar del dieldrín por ruptura del puente epoxídico, pero el hecho, comentado anteriormente, de que en la raíz de judía-- exista un sistema enzimático capaz de catalizar el paso directo de aldrín a aldríndiol, no permite asumir tal hipótesis como única posibilidad. De otro lado, parece plausible suponer que el derivado dicarboxílico VIII procede de la ulterior oxidación del diol, pero asimismo se carece de una confirmación definitiva al respecto.

Operando con cultivos puros de diversos mohos frecuentes en el suelo, Korte et al.⁴⁰ constatan la epoxidación del aldrín, pero no encuentran pruebas que evidencien una ulterior transformación del dieldrín. Análogos resultados negativos obtuvieron Chacko et al.⁴¹ en investigaciones llevadas a cabo con varias especies de Ascomicetos y de Actinomicetos.

Por el contrario, Matsumura y Boush⁴² encuentran que de terminadas muestras de suelos fértiles muestran capacidad para transformar proporciones que oscilan entre el 1 y el 6 % del dieldrín que se les adiciona, en varios productos metabólicos de naturaleza desconocida, y un corto número de microorganismos aislados de tales suelos demuestra poseer un elevado grado de esta capacidad, originando varios metabolitos hidrosolubles, de naturaleza aparentemente acídica, pero que hasta el momento permanecen sin identificar.

En concordancia con estos últimos resultados se encuentran los de Tu et al.⁴³, quienes, operando con cultivos puros de un gran número de microorganismos del suelo, hallan que, además de una mayor o menor capacidad en la mayoría de ellos para la conversión de aldrín en dieldrín, un número mucho más reducido actúa, a veces tras un periodo de adaptación, sobre el dieldrín. La evidencia procede del hecho de que, en tales casos, la concentración de dieldrín en el cultivo pasa por un máximo y experimenta luego un decaimiento, existiendo asimismo pruebas indirectas que sugieren la transformación del aldrín en otros productos--

diferentes del dieldrín; pero tampoco estos autores proporcionan datos acerca de la estructura de los posibles metabolitos implicados en estos procesos.

Los resultados que de un modo más definitivo apoyan la hipótesis de una diversidad de rutas metabólicas que partan directamente del aldrín, en microorganismos del suelo, fueron obtenidos por Korte et al.⁴⁰, quienes, cultivando varias especies de *Penicillium* y *Aspergillus* en medios que contenían aldrín - C^{14} , encontraron que, después de la extracción de medio y micelio con disolventes orgánicos (proceso en el que se separaban aldrín intransformado y dieldrín), entre un 40 y un 60 % de la radiactividad total permanecía en forma de productos hidrofílicos, los cuales, puesto que las especies ensayadas no poseían capacidad de acción sobre el dieldrín, eran, evidentemente, derivados del aldrín sin la intervención del epóxido como metabolito intermedio. Tampoco en este caso existen hipótesis estructurales concretas.

Resulta pues claramente perceptible que, en el momento actual, el tema del metabolismo del aldrín y dieldrín por microorganismos del suelo necesita ser ampliado en tres direcciones fundamentales:

1 - Hacia la obtención de conclusiones estructurales definidas por lo que se refiere a los metabolitos que ya han sido detectados pero no identificados, o a otros nuevos.

2 - Hacia la aclaración de las rutas metabólicas que puedan seguir estos insecticidas una vez puestas en contacto con los sistemas enzimáticos de los microorganismos, así como la estimación del valor de tales procesos, en tanto-- en cuanto pueden constituir sistemas de descontaminación-- natural del medio, y el estudio de los posibles factores-- que puedan afectarlos. A este último respecto, cabe señalar que Poonawalla y Korte encuentran que el β - dihidro-- heptacloro es transformado⁴⁴ por muestras de suelos fértiles en varios productos metabólicos cuando se añade a concentraciones de 10 ppm, mientras que a 5 ppm no se detecta--- transformación alguna.

3 - Hacia el estudio de las repercusiones que sobre-- los microorganismos puede tener su acción sobre los insecticidas. Miles et al.⁴⁵ señalan la supresión de metabolitos-- naturales fúngicos no identificados, después de la incubación de *Trichoderma* sp. en presencia de aldrín y heptacloro.

P A R T E I I

T E C N I C A

E X P E R I M E N T A L

M E T O D O L O G I A
Y
M A T E R I A L E S

1 - METODOLOGIA; JUSTIFICACION DE LA MISMA.

Para la realización de este trabajo, cuyo objetivo--- fundamental es el conocimiento de las posibilidades de degradación del insecticida órganoclorado ciclodiénico al--- drín en suelos agrícolas (1), se ha operado esencialmente, a través de diversas técnicas analíticas, sobre extractos--- obtenidos después de la incubación de diferentes especies--- de hongos aislados de muestras de suelo en medios conte--- niendo concentraciones variables del insecticida.

El intervalo de variación para las concentraciones de aldrín comprende, en general, desde 0,5 hasta 10 ppm. El--- límite inferior viene dado por la necesidad de obtener re--- sultados analíticos en los que puedan descartarse con fa--- cilidad los efectos de varias posibles interferencias, así como la de manejar datos cuantitativos con errores relati--- vos minimizados. El límite superior se condiciona al con--- cepto de contaminación residual en sus aspectos cuantita--- tivos. Con un planteamiento de estas características, ni--- veles de aldrín que excedan de las 10 ppm en el entorno de un eslabón trófico bajo, como lo constituyen los hongos---

(1) - El aldrín, así como su derivado epoxidado, el diel--- drín, es uno de los insecticidas de más amplia utilización en aplicaciones efectuadas directamente sobre el suelo.

del suelo, parecen tener, desde un punto de vista real y práctico, escasas probabilidades de producirse, al menos-- por el momento, y, de hacerlo, indudablemente plantearían un problema toxicológico directo e inmediato que en buena parte escaparía a la atención del particular enfoque que-- ahora nos ocupa.

Por otra parte, a la luz gradual de los resultados--- experimentales obtenidos, se puso paulatinamente de mani-- fiesto que las dinámicas más interesantes y que en cierto modo permiten un control o una predicción de las transformaciones experimentadas por el insecticida, se encuentran a concentraciones relativamente bajas del mismo, mientras-- que, por lo general, a concentraciones que sobrepasan las-- 10 ppm y que ejercen efectos inhibitorios claramente mani-- fiestos sobre el normal desarrollo de los cultivos, quedan notablemente restringidos aquellos mecanismos a través de los cuales el aldrín puede transformarse en metabolitos--- atóxicos, de toxicidad más moderada, menos estables o de-- mayor movilidad ambiental.

Como microorganismos objeto de ensayo se han elegido-- varias especies de hongos, por una serie de razones clasi-- ficables en tres grupos:

a) La permeabilidad de los hongos frente a las sus--- tancias presentes en su medio es mucho menos selectiva que la de cualquier otra forma microbiana del suelo.

b) La actividad metabólica de los hongos es la más--- intensa e indiferenciada de las que se dan entre los com-- ponentes de la microflora edáfica.

c) En el proceso natural de la degradación de los hidrocarburos en el medio ambiente, son los hongos, por lo general, los responsables de las primeras transformaciones bioquímicas, ocupando lugar preponderante diversos mecanismos oxidativos de relativa potencia, que requieren oxígeno molecular, son catalizados por oxigenasas de especificidad variada y probablemente se localizan en la membrana citoplásmica.

1.1 - METODOS PARA EL AISLAMIENTO Y CULTIVO DE HONGOS DE SUELOS AGRICOLAS.

Para efectuar el aislamiento, se toman 50 gramos de una muestra de suelo (1) y se agitan durante 30 minutos con 100 ml de agua destilada; la suspensión así obtenida se deja sedimentar durante 15 minutos y con el sobrenadante se preparan una serie de diluciones (desde 10^{-1} hasta 10^{-6} de la dilución original), de cada una de las cuales se siembra un grupo de placas Petri conteniendo un medio compuesto por glucosa - 5 g -, peptona - 5 g -, extracto de levaduras - 1 g - y agua destilada - 1000 ml -, esterilizado en autoclave a 0,75 atmósferas durante 20 minutos y gelificado con agar no nutritivo al 2 %.

De las colonias de naturaleza fúngica que paulatinamente se individualizan en las placas, se toman, con el extremo de una aguja de siembra, inóculos que, suspendidos en un pequeño volumen de agua destilada estéril, se resiembran en las mismas condiciones en una nueva serie de placas, manipulación que se repite hasta lograr el desarrollo de una sola especie por placa (normalmente son suficientes dos siembras). En este momento se procede a su iden--

(1) - Finca experimental "La Canaleja" (provincia de Madrid), del Instituto de Investigaciones Agronómicas. En relación con las características edafológicas y microbiológicas de las muestras, véanse los apartados correspondientes en la sección de "Resultados".

tificación y cada especie aislada se cultiva por triplicado en tubo ("agar inclinado"). Los tubos se almacenan a temperatura de 2 - 5° C y los cultivos se renuevan cada 30 días aproximadamente.

En distintos momentos, a lo largo del desarrollo de este trabajo, se establecieron series de comparaciones entre los resultados experimentales obtenidos con las especies originarias de las muestras de "La Canaleja" y con estirpes de pureza rigurosamente controlada, suministradas por el Centralbureau voor Schimmecultures de Delft (Holanda), no habiéndose encontrado en ningún caso discrepancias significativas en cuanto al comportamiento metabólico, al menos frente a los insecticidas objeto de nuestro estudio, entre las especies de ambas procedencias.

En ningún momento, durante las operaciones de aislamiento, se utilizó un medio que contuviese insecticida, a fin de evitar la posibilidad de que algún componente cuantitativa o cualitativamente importante de la población fúngica del suelo escogido fuese eliminado inadvertidamente si el producto presentaba particular toxicidad en su caso. Los microorganismos ensayados no fueron pues, objeto de ninguna selección previa en razón de su capacidad para actuar sobre los insecticidas estudiados.

Por otra parte, y con objeto de caracterizar posibles especies en absoluto incapaces de desarrollarse en presencia de aldrín o dieldrín, se llevaron a cabo paralelamente operaciones análogas a las de aislamiento, pero en presen-

cia de tales insecticidas. Las semejantes características del desarrollo global en ambos tipos de cultivos, no permitieron establecer clara y definitivamente conclusiones precisas a este respecto (podría mencionarse cierta preponderancia de varias especies de *Penicillium* sobre los *Aspergillus*), pero sí resultó evidente que ninguna especie era inhibida de un modo total.

1.2 - PLANTEAMIENTO GENERAL DE LAS EXPERIENCIAS DE IN CUBACION.

Con arreglo a los objetivos que previamente se habían marcado, las primeras experiencias se plantearon dirigidas, a la obtención de información general sobre tres cuestiones de carácter básico:

a) Capacidad de cada uno de los microorganismos aislados para desarrollarse en medios de cultivo cuya única fuente de carbono orgánico esté representada por alguno de los insecticidas objeto de estudio.

b) Capacidad de los microorganismos para adaptarse a la utilización de insecticida como única fuente orgánica de carbono, especialmente en aquellos casos en los cuales el ataque a la molécula clorada se manifiesta más intenso en presencia de fuentes suplementarias de energía. Para ello se siguió el método de intentar determinar una acción metabólica de tipo endógeno (autometabolismo), sobre el insecticida acumulado en el micelio después de un periodo de incubación en un medio rico en carbono orgánico utilizable por el microorganismo.

c) Características de la acción de cada una de las especies aisladas sobre los insecticidas aldrín y dieldrín, cuando éstos se adicionan a medios que contienen una o va-

rias fuentes de carbono utilizables por el microorganismo y adecuadas para su normal desarrollo.

1.2.1 - INCORPORACION DEL INSECTICIDA A LOS MEDIOS DE CULTIVO.

La baja solubilidad en agua de los insecticidas utilizados ($<0,5$ ppm en agua destilada a 20°C), dificultaba su incorporación a los medios de cultivo con la necesaria homogeneidad. La adición del producto en forma sólida, aun finamente pulverizada, constituyó un procedimiento inadecuado, tanto aplicado a medios líquidos como a sustratos gelificados con agar: en el primer caso, si con el micelio recogido después de un determinado periodo de incubación se hacían varias fracciones equivalentes y se extraían por separado, el contenido en insecticida variaba de unas a otras entre amplios límites. En el segundo caso, sucedía lo mismo con los valores correspondientes a placas con concentraciones teóricamente iguales.

Tampoco resultó practicable, por su escasa precisión, el método consistente en la adición al medio de gel de sílice impregnada con el insecticida por evaporación de una solución etérea del mismo: no del todo ineficaz cuando la incubación se verifica en medio líquido y con agitación continua, da lugar, cuando se aplica a medios agarizados, a placas con un gradiente vertical de concentración.

Por estas razones, y pese a que ciertos autores⁴⁶ pare-

cen hacer hincapié en la conveniencia de no utilizar disolventes ni emulsificantes en este tipo de experiencias, en beneficio de la reproductibilidad de los resultados cuan--titativos hubo de recurrirse a los primeros.

Así, para la incorporación de insecticida a medios de cultivo líquidos, se utilizó una solución del mismo en acetona, a la concentración conveniente, de la cual se añade, en condiciones asépticas, un volumen equivalente al 0,2 %-del volumen del medio, después de su esterilización pero--antes de proceder a su siembra. Un volumen igual de acetona pura se añade asimismo a todos los cultivos de control.

Cuando se trata de ensayos sobre sustratos sólidos,--una vez gelificado el medio en las placas, y con éstas en posición perfectamente horizontal, se baña su superficie--con una solución etérea del insecticida, efectuándose la--siembra después de la completa evaporación del éter (aná--loga operación se lleva a cabo con éter puro en las placas destinadas a control). De un modo arbitrario, se ha ele--gido en estos casos, como unidad de concentración de insecticida, el $\mu\text{g} / \text{cm}^2$.

1.2.2 - CONTROLES. CONDICIONES DE INCUBACION.

A fin de eliminar interpretaciones erróneas derivadas de una serie de interferencias de variada naturaleza (en--ocasiones difíciles de poner de manifiesto y que más ade--

lante serán discutidas con mayor detalle) que pueden producirse a lo largo del estudio de un ensayo determinado,-- resulta indispensable la utilización de diversos datos de control a los cuales deben referirse todos los resultados obtenidos con cada serie de cultivos. Así pues, y de acuerdo con los objetivos señalados al principio de este capítulo, se llevan a cabo de modo paralelo los siguientes tipos de experiencias:

1 - Cultivo de cada una de las especies aisladas en medios que, como única fuente orgánica de carbono, contengan proporciones variables de insecticida. Tal prueba se efectúa, con cada especie, frente a dos diferentes tipos de medios salinos.

2 - Cultivo de las mismas especies en medios que, conteniendo proporciones variables de insecticida, sean además portadores de alguna otra fuente adicional de carbono-orgánico fácilmente utilizable por el microorganismo.

3 - Incubaciones en ausencia de insecticida, a fin de detectar interferencias que, determinadas por productos del metabolismo fúngico sin relación estructural con aquél, pueden resultar difíciles de desenmascarar con los métodos analíticos utilizados. Este control se lleva a cabo en cada una de las series de cultivos que se efectúan.

4 - Agitaciones de insecticida en medios estériles y bajo las mismas condiciones que los cultivos, con objeto--

de determinar las características de posibles alteraciones del producto imputables a acciones de naturaleza física o química. La comprobación se repite para cada nuevo medio--de cultivo que se ensaya.

En aquellos casos en los que se intenta provocar un--metabolismo endógeno, el microorganismo se cultiva durante un periodo de 3 a 6 días en un medio adecuado para su desa--rrollo y en presencia de insecticida, lo cual da como re--sultado la acumulación del mismo en el micelio en propor--ciones que, variables según la especie de que se trate, re--sultan siempre notablemente elevadas en relación con la---concentración adicionada al medio. Al término de dicho pe--riodo se recoge el micelio por centrifugación a baja velo--cidad y se somete a dos lavados en una solución salina iso--tónica, seguidos de sendas centrifugaciones. El micelio---tratado de este modo se resuspende en un medio salino es--téril, carente de fuentes de carbono orgánico, y se reanu--da la incubación durante otros 30 días o hasta que se ob--serve una fuerte involución del cultivo.

Con respecto a las condiciones bajo las cuales se lle--van a cabo los ensayos, se procura en todo momento obtener un máximo de estandarización (incluso en la forma de los erlenmeyer utilizados para las incubaciones), con objeto--de minimizar las frecuentes fluctuaciones que presentan---los cultivos fúngicos, dependientes de un gran número de--variables externas.

Los inóculos consisten en suspensiones de esporas, a la misma dilución para cada serie de pruebas, preparadas a partir de cultivos recientes en tubo, y la temperatura se mantiene a 28 - 30° C. Cuando el medio de cultivo es líquido, se utilizan erlenmeyer de 1000 ml llenos hasta un volumen, como es lo usual, equivalente a la quinta parte de su capacidad total, y, puesto que se espera un metabolismo--- esencialmente oxidativo del insecticida, se acentúa la aerobiosis mediante agitación constante a un ritmo de 75 ciclos por minuto.

1.2.3 - MEDIOS DE CULTIVO.

En un principio se ensayaron diferentes medios, caren-
tes unos de fuente de carbono orgánico que no fuese el in-
secticida, y otros con proporciones variables de una o va-
rias de aquéllas. En la tabla VII se dan las composiciones
de los que se emplearon más intensivamente, designados ar-
bitrariamente M₁ ... M₅.

Una vez que las primeras series de resultados experi-
mentales pusieron de manifiesto la incapacidad de todas---
las especies aisladas para utilizar el insecticida como---
fuente de energía, así como el hecho de que las transfor-
maciones experimentadas por el mismo cedían cuando la po-
blación microbiana se estacionaba, se seleccionó el medio-
que más eficazmente era utilizado para la síntesis de bio-
masa. Y puesto que:

TABLA VII - Medios de cultivo ensayados.

M ₁	Fuente de C*.....	2 a 5 %	
	SO ₄ Fe.7 H ₂ O.....	0,001 g	
	SO ₄ Mg.7 H ₂ O.....	0,2 g	
	SO ₄ Ca.....	0,2 g	0,75 atm./
	PO ₄ HK ₂	0,2 g	/20 min.
	NO ₃ NH ₄	0,3 g	
	H ₂ O destilada.....	1000 ml	
M ₂	Glucosa.....	2 g	
	Citrato-Na.3 H ₂ O.....	0,5 g	
	PO ₄ HK ₂	7 g	0,75 atm./
	PO ₄ H ₂ K.....	3 g	/20 min.
	SO ₄ Mg.7 H ₂ O.....	0,1 g	
	SO ₄ (NH ₄) ₂	1 g	
	H ₂ O destilada.....	1000 ml	
M ₃	Peptona.....	10 g	
	Extracto de levaduras.....	5 g	0,75 atm./
	ClNa.....	5 g	/25 min.
	H ₂ O destilada.....	1000 ml	
M ₄	Glucosa.....	5 g	
	Peptona.....	5 g	0,75 atm./
	Extracto de levaduras.....	1 g	/20 min.
	H ₂ O destilada.....	1000 ml	
M ₅	Glucosa.....	50 g	
	Asparraguina.....	1 g	
	SO ₄ Mg.7 H ₂ O.....	0,5 g	Vapor /
	PO ₄ H ₂ K.....	1,5 g	/60 min.
	H ₂ O destilada.....	1000 ml	

* - Glucosa o manitol

$$N = K C$$

Siendo N el rendimiento celular, C la concentración-- inicial del producto limitante del medio y K una constante dependiente de la "calidad" de dicho producto limitante, y pudiendo tomarse el peso seco del micelio como una estimación del rendimiento celular, quedó claro que, en tales--- condiciones, el medio más apropiado era el M₄. Como, por-- otra parte, dicho medio resultó desprovisto de interferencias cromatográficas indeseables (un extracto etéreo del mismo no produjo señales cuando se examinó por cromatografía gas - líquido con detección por captura de electrones) al menos antes de haber sostenido una incubación, fue utilizado sistemáticamente en las experiencias ulteriores.

1.3 - SISTEMAS PARA LA EXTRACCION DE LOS PRODUCTOS DE BIOTRANSFORMACION.

Una vez finalizados los periodos de incubación, se---procede a la centrifugación a baja velocidad del cultivo, con objeto de separar del medio la masa de micelio formada. El sedimento se lava una vez con un pequeño volumen de una solución de la misma composición que el medio utilizado, repitiéndose la centrifugación en las mismas condiciones. Ambos sobrenadantes se reúnen ("medio"), para su extracción por separado del sedimento ("micelio").

En aquellos casos en que el micelio de la especie objeto de ensayo se desarrolla formando aglutinados esferoidales suficientemente consistentes, las anteriores operaciones pueden sustituirse por un simple filtrado a través de papel Albet nº 240, lo cual conduce a resultados cuantitativos enteramente análogos.

La extracción de medio se lleva a cabo agitando un---volumen del mismo, en un embudo de decantación, con un volumen igual de éter etílico. Repetida por tres veces esta operación, se reúnen los extractos etéreos, se secan con sulfato sódico anhidro y se llevan a un volumen conveniente en un evaporador Kuderna - Danish.

Comparando el rendimiento de este método con el obtenido utilizando un aparato de extracción continua líquido-

- líquido, los índices de recuperabilidad resultaron aproximadamente iguales, por lo que, dada su sencillez, se siguió siempre el primero, al menos para las determinaciones rutinarias.

El micelio, previamente desecado a 35° C y presión ligeramente reducida, se homogeneiza en un mortero de vidrio con arena de cuarzo lavada al ácido. El homogenato se transfiere a un aparato Soxhlet y se extrae con acetona - hexano (60 : 40 v/v) durante 6 horas. El extracto se lleva a un volumen reducido en un evaporador Kuderna - Danish y luego a sequedad en corriente de aire seco, recogién-- el residuo en un volumen conveniente de hexano.

Cuando se efectúan ensayos sobre medio sólido, la totalidad del gel contenido en cada placa se homogeneiza de modo análogo al que se acaba de describir, con arena de--- cuarzo y una cantidad suficiente de sulfato sódico anhidro hasta la obtención de un polvo fino y seco que se somete-- al mismo tratamiento que los homogenatos de micelio.

1.4 - PURIFICACION DE LOS EXTRACTOS.

En los extractos que se obtienen cuando se siguen los procedimientos que acabamos de describir, se da con cierta frecuencia (aun cuando se utilice un método analítico de selectividad relativamente elevada, como la cromatografía de gas - líquido con sistema de detección por captura de electrones), el fenómeno de la aparición de señales originadas por compuestos no relacionados químicamente con el insecticida objeto de estudio y que deben de corresponder, por tanto, a diversos posibles productos del metabolismo fúngico, acumulados en el medio o el micelio durante el periodo de incubación, arrastrados por el disolvente utilizado en la extracción y con suficiente afinidad electrónica para determinar una respuesta del detector. Alcanos policíclicos, ciertos hidrocarburos aromáticos y, en general, compuestos que contengan en su molécula átomos de S, P, o grupos carbonilo, podrían ser causa de este tipo de interferencias.

Existen una serie de procedimientos basados en operaciones de índole puramente cromatográfica, y sobre los que volveremos a tratar más adelante, que pueden utilizarse para desenmascarar tales interferencias: el trabajo entre márgenes relativamente amplios para los valores de voltaje aplicados al detector, constituye un sistema que, al provocar incrementos positivos o negativos de la respuesta de un modo selectivo para determinados tipos de estructuras--

química, resulta de utilidad en numerosas ocasiones.

Es de subrayar que estos artefactos pueden ofrecer un interés nada despreciable cuando su aparición, o las proporciones en que aparecen, son susceptibles de relacionarse con alguna variable sujeta a control de los cultivos,-- como, por ejemplo, el valor de la concentración inicial de insecticida que se adicionó al medio. Algunos autores llegan incluso a sugerir que el análisis sistemático de estos hechos constituye, en principio, un método fecundo de enfrentamiento al problema de las interacciones insecticida-- microorganismo.

De cualquier modo, es muy conveniente, en particular durante los primeros ensayos que se realizan con un determinado microorganismo, y antes de conocer el comportamiento cromatográfico de los extractos a que éste da lugar después de su incubación en un medio concreto de cultivo, poseer una relativa seguridad de que las señales que van a producirse corresponden efectivamente a estructuras químicas emparentadas más o menos directamente con el insecticida adicionado al cultivo.

Los procedimientos de purificación que a continuación se describen, proporcionan un elevado grado de garantías a este respecto.

1.4.1 - REPARTO ENTRE DISOLVENTES INMISCIBLES.

Se siguieron dos tipos de métodos que, bien en su for

ma original, o bien más o menos modificados en sus detalles, resultan ya clásicos en las publicaciones sobre análisis residual de plaguicidas. En términos generales, puede decirse que ninguno de ambos procedimientos altera sustancialmente los resultados cuantitativos, si bien, como posteriormente tendremos ocasión de comentar, pueden ocasionar pérdidas de consideración cuando se aplican a extractos que contienen determinados metabolitos de polaridad media. Una esquematización de los dos sistemas de reparto empleados se da en las figuras 7 y 8.

REPARTO HEXANO / DIMETILFORMAMIDA⁴⁷ - El extracto a purificar, en hexano y a un volumen de 25 ml, se agita en un embudo de decantación con 10 ml de dimetilformamida (DMF) previamente saturada con hexano. Repetida por tres veces esta operación y desechada la fracción de hexano, se agitan las tres fracciones de DMF reunidas en un segundo embudo de decantación, con 10 ml de hexano saturado con DMF. Separado el hexano, se agita a su vez con 10 ml de DMF (saturada con hexano), la cual, decantada y reunida con la procedente de las anteriores decantaciones, se vierte en un tercer embudo con 200 ml de una solución acuosa al 2 % de sulfato sódico. La mezcla se agita vigorosamente durante 2 minutos y se deja reposar durante otros 20 hasta la separación, en una capa superior, del hexano que saturaba a la DMF. Decantada y desechada la fase acuosa, se recoge la fracción de hexano, a la que se añade un pequeño volumen del mismo resultante de la reunión de dos o tres lavados que deben efectuarse al tercer embudo. El volumen final de hexano se seca con sulfato sódico anhidro y se

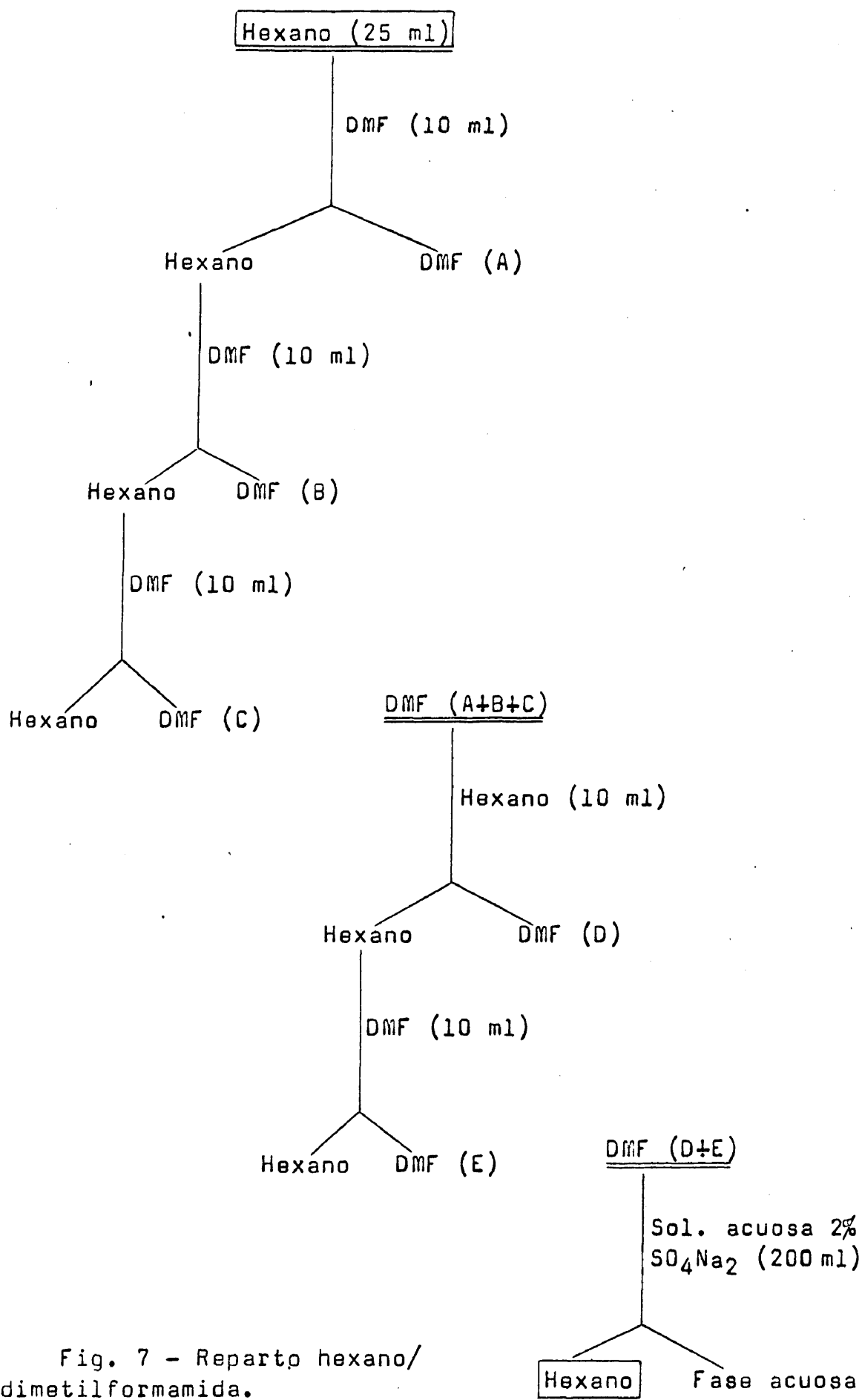


Fig. 7 - Reparto hexano/
/dimetilformamida.

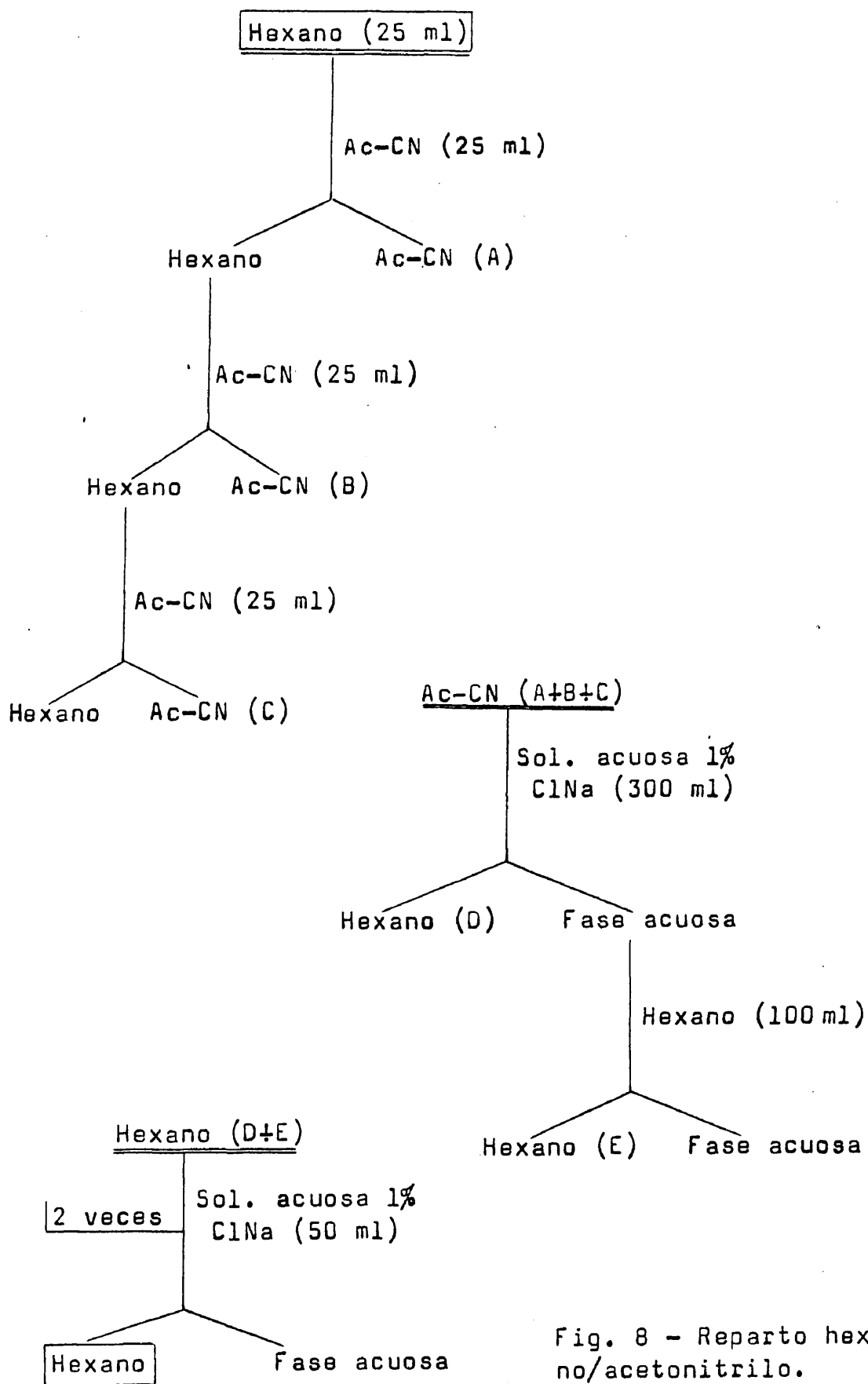


Fig. 8 - Reparto hexano/acetonitrilo.

concentra en corriente de aire seco hasta las proporciones convenientes.

REPARTO HEXANO / ACETONITRILLO⁴⁸ - El extracto a purificar, en hexano y a un volumen de 25 ml, se agita en un embudo de decantación con un volumen equivalente de acetonitrilo previamente saturado con hexano. Repetida por tres veces esta operación, se desecha la fracción de hexano y, reunidas las tres fracciones de acetonitrilo, se agitan a su vez enérgicamente con 300 ml de una solución acuosa de cloruro sódico al 1 %. El conjunto se deja reposar durante 20 minutos, transcurridos los cuales puede recogerse la capa superior de hexano, separada a expensas del que se encontraba saturando al acetonitrilo. La fase inferior, acuosa, se agita ahora con 100 ml de hexano que, una vez decantados e incorporados al volumen anteriormente obtenido, se lavan dos veces con 50 ml de la solución de cloruro sódico cada vez. Desechadas todas las fases acuosas, el hexano se seca con sulfato sódico anhidro y se concentra hasta un volumen conveniente.

1.4.2 - CROMATOGRAFIA DE ADSORCION.

Las soluciones con un contenido particularmente elevado de impurezas, pueden necesitar, antes de proceder a su análisis cuali y cuantitativo por métodos cromatográficos, de una ulterior purificación. Ello ocurre, por ejemplo, cuando se manejan extractos muy concentrados de micelio o soluciones procedentes de la extracción de volúmenes

relativamente elevados de medio de cultivo.

En otras ocasiones, la escasa proporción de impurezas presente en los extractos, permite prescindir de los métodos de reparto, a menudo más inseguros desde un punto de vista cuantitativo, para utilizar exclusivamente los basados en cromatografía de adsorción y que a continuación describimos.

Una columna de 1,5 cm de diámetro interno se llena hasta una altura de 12 cm con Florisil de 80 - 100 mallas,--- previamente activado por calentamiento a 650° C durante 2- horas, cuidando que el empaquetamiento resulte apretado y homogéneo. Sobre el Florisil se deposita una capa de sulfato sódico anhidro de 1 a 2 cm de espesor; se añade cuantitativamente la solución a purificar llevada a un volumen que no debe exceder de 3 ml y el sistema se eluye lentamente con 250 ml de hexano - éter (90 : 10). En un evaporador Kuderna - Danish puede concentrarse el eluato hasta el volumen deseado.

Los índices de recuperabilidad obtenidos con este procedimiento resultan, por lo general, aceptables, excepto-- para determinados metabolitos de relativa polaridad del aldrín, que se producen en cultivos de *Penicillium glaucum*.-- En este caso, y para evitar que tales productos permanezcan retenidos, al menos parcialmente, en la columna, se hace necesario recurrir a la desactivación parcial del Florisil (que puede llevarse a cabo adicionándole de un 1 a un 3 % v/p de agua desionizada), al empleo de superiores-

volúmenes de eluyente o al incremento de la proporción de-
éster en el mismo. Cualquiera de las tres soluciones presenta,
sin embargo, el inconveniente de que contribuye a la--
elución de impurezas.

1.5 - ANALISIS DE LOS EXTRACTOS.

Finalizadas las operaciones de purificación, los extractos se encuentran preparados para su análisis cuali y cuantitativo por diversos métodos, fundamentalmente cromatográficos, que incluyen técnicas de capa fina y, sobre todo, de gas - líquido. Estas últimas se emplean en todas las determinaciones sistemáticas y sólo a modo de comprobación en algunos casos dudosos, o cuando se hace necesaria la obtención de cantidades relativamente elevadas de ciertos productos, se recurre a la cromatografía en capa fina.

A continuación se pasa a comentar las técnicas utilizadas, así como la problemática particular planteada por cada una de ellas.

1.5.1 - CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

Se utilizan capas adsorbentes de 250 u de espesor, de Silicagel G (Stahl), Alúmina tipo T (neutra) y Alúmina tipo G (básica), de la casa Merck.

PREPARACION DE LAS PLACAS - Para cada 4 placas de 20.20 cm (o 16 de 20.5 cm), se toman 55 - 60 g de Alúmina (o Silicagel), a los que se añaden 95 - 100 ml de agua--

desionizada, agitando hasta obtener una suspensión homogénea, sin grumos ni burbujas. Una vez cubiertas las placas con la capa adsorbente, se dejan secar a temperatura ambiente durante 10 - 15 minutos y luego se introducen en una estufa a 130° C durante otros 45 minutos. Enfriadas a temperatura ambiente, se almacenan en una cubeta con un agente desecante.

Antes de su utilización, y con objeto de evitar posibles interferencias causadas por impurezas hidrosolubles, se procede a un lavado de la capa adsorbente, que se efectúa en una cubeta de desarrollo con agua destilada (puede también utilizarse acetona - agua 50 : 50), que se permite ascender hasta una altura de unos 3 cm por encima del nivel que posteriormente alcanzará el frente de la fase móvil.

REACTIVO CROMOGENICO Y REVELADO - El reactivo cromogénico se prepara según el método de Kovacs,⁴⁹ ligeramente modificado: 110 mg de NO_3Ag se disuelven, dentro de un frasco topacio, en 1 ml de agua destilada; se añaden 10 ml de 2-fenoxietanol y se completa el volumen hasta 100 ml con acetona pura. Se adicionan 1 o 2 gotas de agua oxigenada al 30 % y se conserva, en frasco topacio, en un lugar oscuro. Este reactivo puede ser utilizado en tanto no adquiera coloración amarillenta.

Para el revelado de las placas desarrolladas, una vez seca a temperatura ambiente la fase móvil, se efectúa una

pulverización homogénea, intensa, pero procurando que la--
capa adsorbente no llegue a humedecerse, con el agente cro-
mogénico. Se seca a 50° C durante 1 - 2 minutos y se expo-
ne a luz U.V. (2537 Å).

La sensibilidad obtenida con este método puede llegar
hasta 0,1 ug. Cuando se emplean capas de Alúmina, los com-
puestos clorados se revelan como manchas oscuras sobre fon-
do claro; cuando se usa Silicagel, en ocasiones y sin que-
pueda darse una explicación concreta, ocurre el fenómeno--
opuesto: el fondo se ennegrece, destacando los productos--
clorados como manchas claras.

SISTEMAS DE DESARROLLO - En determinados casos se uti-
liza una fase estacionaria consistente en una solución eté-
rea al 5 % de parafina; por lo general, sin embargo, las--
separaciones se llevan a cabo con el empleo exclusivo de--
una fase móvil. A este fin, se realizaron diversos ensayos
según procedimientos perfeccionados típicos o más o menos-
modificados, que incluían fases móviles de n-heptano, iso-
octano, cloroformo, hexano - éter (varias proporciones,--
en particular 90 : 10), ciclohexano - acetato de etilo---
(65 : 35), isooctano - éter (70 : 30) e isooctano - pí-
ridina (70 - 30).

En ocasiones, la cromatografía en capa fina constitu-
ye un valioso auxiliar que complementa los datos obtenidos
por cromatografía en fase gaseosa y ayuda a decidir en ca-
sos dudosos. Por ejemplo, en aquellos compuestos que pro--

ducen señal cuando se emplea el segundo método, pero no---
sean revelables mediante el primero, queda descartada su---
relación estructural con el insecticida estudiado. Sin em-
bargo, la escasa resolución que, pese a la diversidad de--
sistemas ensayados, proporciona para ciertos pares de pro-
ductos, y su falta de especificidad absoluta (ciertos fos-
folípidos se revelan de un modo enteramente análogo a los-
insecticidas clorados), hacen que los resultados obteni--
dos por este procedimiento no puedan ser considerados como
definitivos en tanto no existan evidencias más sólidas que
los confirmen.

1.5.2 - CROMATOGRAFIA GAS - LIQUIDO.

Constituye el método analítico más utilizado a lo lar-
go del desarrollo de este trabajo, y que, debidamente com-
plementado por diversas pruebas de variada naturaleza, ha-
proporcionado la mayoría de los resultados cuali y cuanti-
tativos que aparecen en esta memoria.

En general, cuando la cromatografía de gas - líquido-
(CGL) sirve de instrumento en estudios sobre metabolis-
mo, han de cuidarse especialmente tres aspectos básicos:

1 - La transferencia cuantitativa de los productos ob-
jeto de estudio desde el medio biológico hasta el aparato-
analizador.

2 - La resolución adecuada de las señales registradas

por el aparato y la ausencia de descomposiciones secundarias durante el proceso de separación cromatográfica.

3 - La especificidad y particularidades de orden cuantitativo del sistema transductor utilizado.

Los problemas derivados de las posibles inexactitudes implicadas en el primero de los aspectos citados, pueden eliminarse a través de unas condiciones de máxima estandarización en la metodología de extracción y purificación de los materiales biológicos, además del cálculo cuidadoso de los índices de recuperabilidad de cada producto para cada sustrato y cada secuencia operatoria seguida. Los factores de multiplicación obtenidos a este fin se aproximan con frecuencia a la unidad para los productos conocidos que se detectaron (en el caso de los desconocidos se hizo preciso, como veremos, operar por diferencia, lo cual, si bien no resulta demasiado exacto en términos de valores absolutos, proporciona datos relativos perfectamente consistentes), y, en cualquier caso, se mantienen con gran constancia dentro de reducidos intervalos.

En cuanto a los aspectos que se aluden en los apartados segundo y tercero, ambos se refieren, de un modo más o menos directo, al proceso de puesta a punto del método instrumental utilizado. Sin necesidad de entrar en detalles sobre la problemática general de la CGL, que puede encontrarse en numerosas y bien documentadas monografías, a continuación se pasan a discutir las particularidades más destacables que presenta su aplicación a nuestro caso concre-

to, esto es, el estudio del metabolismo de insecticidas ci clodiénicos por microorganismos.

LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA - Para la correcta determinación de insecticidas órganoclorados junto con sus meta--bolitos en muestras o medios biológicos, es preciso tener--presente la posibilidad, relativamente elevada, de que se--produzcan solapamientos, a veces difíciles de resolver, interferencias con estructuras químicas sin relación con el--insecticida estudiado o descomposiciones provocadas por fe--nómenos de naturaleza físico - química. Tal posibilidad impone a la metodología a seguir una serie de restricciones--que alcanzan principalmente a la naturaleza de la fase es--tacionaria, las temperaturas de trabajo y, aunque en menor grado, al caudal de gas portador.

En la actualidad existe una abundante bibliografía sobre esta problemática, pudiendo citarse, entre otras, la--revisión de Baluja y Franco (1971)⁵⁰. Nosotros mismos hemos--participado en una serie de trabajos (1969, 1970, 1971)⁵¹⁻⁵⁶,--en los que se describieron y evaluaron los aspectos positivos y negativos de diversas condiciones experimentales, algunas de las cuales figuran en esta memoria.

En relación con las fases estacionarias, y esquematizando la situación de modo sumario, puede decirse que las--fases apolares o de moderada polaridad (Apiezón L, Oronita - polibuteno - 128, o aceites y gomas de silicona tales como DC - 200, DC - 11, SE - 30, SF - 96, OV - 17, etc.)-

TABLA VIII - Condiciones operatorias seleccionadas para las separaciones por CGL.

	Fase est.	Soporte	Temperatura			Volt. det.	Rendim.
			C	D	I		
I	DC-200:10%	Gas Chrom Q 60-80 m.	190	195	215	10	+++
II	DC-200:10% QF-1:15%	Chromosorb W 80-100 m.	185	190	210	3	+
III	DC-200:5% QF-1:7,5%	Chromosorb W 80-100 m.	190	195	215	0,5	+++
IV	Oronita- polibuteno -128:2,56% QF-1:1,95%	Varaport 80-100 m.	160	190	205	1	+
V	Oronita- polibuteno -128:2% QF-1:1,9%	Chromosorb W 80-100 m.	160	195	205	2	++
VI	OV-17:1,5% QF-1:1,95%	Chromosorb W 80-100 m.	180	195	205	2	+

+: Rendimiento normal; ++: Bueno; +++: Muy bueno.

presentan las ventajas de no determinar descomposiciones--
térmicas y de dar valores de retención relativamente bajos
frente a los inconvenientes de su escasa selectividad y ba
ja eficiencia. Con las fases polares (QF - 1, Carbowax),
por el contrario, tienen lugar los efectos opuestos: sue--
len provocar descomposiciones en los productos termolábi--
les y retenciones elevadas, pero son superiores en eficien

cia y selectividad.

Con respecto a las descomposiciones térmicas, es preciso señalar que, al menos en un amplio margen de condiciones usuales de trabajo, ni el aldrín ni el dieldrín las experimentan; pero puesto que "a priori" se ignoraba si las sufrirían alguno de sus posibles metabolitos, se ha procurado no crear en ningún momento condiciones que las favorezcan. La operación con tiempos de retención moderados---acorta los análisis, pero por otra parte, y ello es más importante, particularmente cuando no se trabaja a temperatura programada, proporciona señales geométricamente homogéneas a lo largo de todo el cromatograma (triángulos sensiblemente isósceles con alturas muy superiores a las bases), lo cual permite una mayor exactitud en las determinaciones cuantitativas. No parece necesario comentar la necesidad de lograr óptimos de selectividad y eficiencia.

Parecía lógico esperar que utilizando mezclas de fases apolares y polares se consiguiesen operaciones cromatográficas que gozasen de características intermedias y,--si bien es errónea la suposición de que una fase mixta puede suplantarse a una fase selectiva, el hecho es que mediante su utilización se pueden alterar las retenciones relativas de los componentes de una mezcla dentro de límites--considerables.

En 1964, Mc Culley y Mc Kinley⁵⁷ aplicaron por vez pri-

mera este principio a la separación de mezclas de plaguicidas, empleando con éxito, sobre un soporte sólido de Chromosorb W, una fase estacionaria mixta compuesta por un 4 % de SE - 30 y un 6 % de QF - 1. En 1966, Burke y Holswade⁵⁸ obtuvieron buenas separaciones con cargas elevadas a base de un 10 % de DC - 200 y un 15 % de QF - 1 sobre un soporte de Gas Chrom Q. Posteriormente el mercado se enriqueció con nuevas fases estacionarias y la utilización de diversas combinaciones de las mismas se generalizó.

La tabla VIII resume las condiciones operatorias utilizadas con mayor éxito en las determinaciones por CGL implicadas en el tema de esta memoria (no se han anotado--- otra serie de combinaciones ensayadas cuyos resultados fueron claramente deficientes). Las columnas empleadas, de tipo convencional, son de vidrio Pyrex silanizado (con objeto de minimizar la descomposición de productos termolábiles), arrolladas en espiral, de 1,80 m de longitud y 3 mm de diámetro interno.

Las columnas mixtas con elevada carga de fase, tales como la II (tabla VIII), no obstante su considerable eficiencia, presentan, como señalan Dal Nogare y Juvet⁵⁹ (1965), el inconveniente de dilatar excesivamente los tiempos de retención, con todas las consecuencias de este fenómeno. Por otra parte, el proceso de acondicionamiento en estos casos suele resultar tedioso y la estabilidad de la columna, particularmente cuando ha de operarse a elevadas tem--

peraturas, es relativamente baja debido a la pérdida de fase, lo cual determina una fuerte deriva de la línea de base del registro gráfico, corta vida y peligro de "contaminación" para el detector.

Mejores resultados proporcionan, en términos generales, las columnas mixtas a base de QF - 1 y DC - 200, pero con cargas más moderadas, de hasta la mitad de la anterior, para el mismo tipo de soporte y, en ciertos casos particulares, como para la separación de los productos metabólicos resultantes de la acción del *Penicillium glaucum* sobre el aldrín, las resoluciones óptimas fueron obtenidas con fases mixtas de QF - 1 y Oronita - polibuteno - 128 sobre Chromosorb W (V, tabla VIII).

Pese a las ventajas anotadas para las fases mixtas--- (la gran mayoría de los resultados cuantitativos que se citan en este trabajo fueron obtenidos con tales fases),- a lo largo de nuestra experiencia se puso de manifiesto de un modo progresivo la conveniencia de simultanear su utilización, a ser posible, con la de fases apolares o de polaridad muy moderada, empleadas bajo forma unitaria. En estas condiciones, la metilsilicona DC - 200 fue la que proporcionó los mejores resultados. Las bajas retenciones absolutas que se obtienen de este modo, en especial cuando la fase se encuentra impregnando soportes de bajo número de mallas (I, tabla VIII), acortan sensiblemente el tiempo de análisis y llegan incluso a obtenerse señales en las

que no es preciso considerar más que la altura. Los inconvenientes derivados de su escasa selectividad y eficiencia (en numerosas ocasiones, no obstante, suficientes), quedan compensados, particularmente si mediante el uso paralelo de una segunda columna se pueden resolver las indeterminaciones de la primera, por otras ventajas, fundamentalmente de dos tipos:

1 - La baja polaridad de la columna permite la elución de posibles componentes de fuerte polaridad, que con relativa frecuencia se forman como consecuencia del metabolismo microbiano de los hidrocarburos y que, en otras condiciones, quedarían retenidos en la fase estacionaria o eluirían con tiempos de retención tan exageradamente elevados que no permitirían su detección.

Ya se ha comentado el hecho de que ciertos metabolitos del fotodieldrín excretados en la orina por la ratona hembra, presentan tiempos de retención del orden de una semana (lo cual no pudo ser determinado por métodos estrictamente cromatográficos, sino por el conteo de la radiactividad - puesto que se había utilizado un producto de partida marcado con C^{14} - a la salida del detector). En nuestro caso, como veremos, uno de los metabolitos del aldrín que se produce en cultivos de *Penicillium glaucum*, no hubiera podido ser evidenciado de no haberse utilizado columnas unitarias de fase apolar, puesto que en columnas de fase mixta, aún para muy bajos porcentajes del componente polar, dicho metabolito queda retenido y no resulta posible-

su detección.

2 - Precisamente por su baja selectividad, al hacerse detectables diversos productos del metabolismo fúngico sin relación estructural con el insecticida, pero cuya aparición, inhibición o proporciones en que se formen pueda relacionarse con su presencia, es posible obtener una información más completa sobre las particularidades de la interacción insecticida - microorganismo. La utilización simultánea de otra columna de mayor selectividad, o incluso la comprobación por cromatografía en capa fina, además de--- otros métodos que luego comentaremos, solucionan el problema de las posibles falsas interpretaciones de estas señales.

También la técnica utilizada para el relleno de la columna o la forma de impregnación del soporte sólido por la fase estacionaria pueden tener repercusiones sobre las características de la separación cromatográfica. A fin de minimizar las divergencias en los resultados debidas a este factor, la preparación de las columnas se lleva siempre a cabo como sigue:

La cantidad adecuada de fase o fases se disuelve en--- cloruro de metileno o cloroformo, a la solución se añade--- el peso conveniente de soporte sólido y el exceso de disolvente se elimina lentamente por rotación en vacío. Después de un periodo de alrededor de tres horas de calefacción a una temperatura aproximada de 120° C, con objeto de lograr

el grado de sequedad que se requiere, y guardando las precauciones necesarias para evitar la fractura de los gránulos del soporte, se procede al relleno de la columna, que se efectúa aplicando el vacío que se alcanza con una trompa de agua a uno de sus extremos y cuidando que el empaquetado resulte lo suficientemente apretado como para que, al serle posteriormente aplicada la corriente gaseosa, no se produzcan huecos. Ambos extremos se taponan luego con lana de cuarzo, no siendo aconsejable, como es usual en otros casos, utilizar un refuerzo de malla metálica, al objeto de evitar acciones catalíticas que favorezcan la descomposición de posibles productos termolábiles.

Cuando se trata de la preparación de columnas de fase mixta, es conveniente añadir el soporte a una solución que contenga ya ambas fases en las proporciones precisas, método que da mejores resultados que el mezclado de las fases soportadas aisladamente. La homogeneidad que se logra con el segundo procedimiento nunca es perfecta debido a la diferencia de densidad entre las distintas fases y, por otra parte, durante el proceso de mezclado pueden tener lugar fracturas de gránulo, con la consiguiente alteración del diámetro medio de las partículas de relleno y la ocurrencia de fenómenos de adsorción en la superficie de fractura durante la separación cromatográfica, lo cual suele alterar la geometría de las señales, que aparecen en tal caso con grandes "colas".

Una vez rellenas, las columnas se someten a un proce-

so de acondicionamiento previo que debe prolongarse durante 3 ó 4 días, durante los cuales cada columna, situada ya en el horno del cromatógrafo, que es conveniente mantener a una temperatura que exceda en 20 - 40° C a la normal de trabajo, queda conectada al bloque de inyección del aparato, con objeto de mantener una corriente de gas durante el periodo de acondicionamiento; pero dejando libre el extremo opuesto, que sólo deberá conectarse a la entrada del detector una vez finalizado dicho periodo, en el que, además, la temperatura de aquél no ha de sobrepasar la que le proporcione el sistema calefactor del horno.

Es conveniente, por otra parte, antes de comenzar el trabajo, inyectar por 6 ó 7 veces consecutivas soluciones que contengan aproximadamente los mismos compuestos que van a estudiarse, a una concentración del orden de 100 veces superior a las que se esperan hallar.

Por lo que respecta a la temperatura de trabajo, así como al caudal de gas portador, es preciso llegar al establecimiento de unas condiciones de compromiso, puesto que si bien el mantenimiento de la columna a bajas temperaturas disminuye las probabilidades de descomposición térmica, el incremento en el caudal de gas necesario para compensar las elevadas retenciones que de este modo se producen (por otra parte los caudales excesivamente moderados aumentan el riesgo de descomposición de posibles estructuras termolábiles), disminuye la eficacia del sistema separador, así como la respuesta del detector. Las elevadas-

temperaturas de columna pueden, además, como ya se mencionó, determinar pérdidas de fase ("sangrado") en aquellos rellenos excesivamente cargados. En el desarrollo de este trabajo no se han sobrepasado (tabla VIII) los 190° C, -- salvo en casos excepcionales en los cuales, con columnas -- del tipo de la III, se alcanzaron los 200° C.

Como gas portador se utilizó fundamentalmente nitrógeno de elevado grado de pureza y, en casos aislados, argón - metano (95 : 5), mezcla que algunos autores aconsejan como más conveniente cuando, como en este caso, se emplea un detector de captura electrónica, por precisar éste un menor voltaje de polarización debido a la superior movilidad electrónica en dicha mezcla. Sin embargo, y acaso determinado simplemente por factores de calidad, los mejores resultados se obtuvieron con nitrógeno, mientras que con argón - metano la línea de base quedaba afectada de un ruido, a veces relativamente intenso, que interfería en la determinación de señales débiles.

LA DETECCION POR CAPTURA ELECTRONICA - Para la realización de las determinaciones cromatográficas (CGL) que se mencionan en esta memoria, se dispuso de dos aparatos -- Perkin - Elmer, modelo F - 11, con detector de captura de electrones, electrodo de tipo concéntrico y fuentes de radiación de tritio en un caso y Ni^{63} en otro.

La fuente de tritio presenta el inconveniente de que-

cuando la temperatura de trabajo excede los 200° C, tiene lugar la pérdida de material radiactivo, con lo que la sensibilidad decae rápidamente (en el caso del Ni^{63} se puede llegar sin peligro a los 350° C). En ambos casos, si las condiciones operatorias se ajustan cuidadosamente, en particular por lo que se refiere al voltaje y temperatura que se aplican al detector, temperatura de la columna y caudal de gas portador, es posible alcanzar con facilidad sensibilidades de hasta 10 picogramos (10^{-11}g), sin errores de significación.

Aún cuando el detector de captura electrónica se clasifica entre los selectivos, su respuesta no es específica para los plaguicidas clorados, por lo que, y particularmente cuando, como en nuestro caso, se ha de operar con extractos complejos, procedentes de medios biológicos, antes de atribuir tal o cual significación a una determinada señal, es preciso cerciorarse por todos los métodos de que se disponga de su relación estructural con el insecticida estudiado. A este respecto resultan de gran utilidad los métodos de espectrofotometría IR y espectrometría de masas combinados con la CGL, pero los exiguos tamaños de muestra de que por lo general se dispone, exigen el montaje de delicadas microtécnicas que no suelen ser asequibles a todos los laboratorios.

Los procesos de purificación ya descritos pueden proporcionar un elevado grado de garantías sobre este punto, aunque tal seguridad no puede considerarse absoluta: en---

ocasiones los métodos de reparto y cromatografía de adsorción en columna son incapaces de eliminar totalmente determinados tipos de impurezas, mientras que puede también darse el fenómeno opuesto, esto es, que metabolitos de insecticidas órganoclorados resulten afectados de pérdidas importantes. Al mismo fin pueden asimismo servir, como ya se ha señalado, la cromatografía en capa fina y, en ciertos casos muy concretos, determinados tipos de pruebas químicas en combinación con la CGL; pero muchas veces un "test" de índole puramente cromatográfica puede proporcionar también una valiosa información.

Es sabido que la intensidad de la corriente de ionización en un detector de captura electrónica viene dada por la expresión:

$$I = I_0 e^{-k c a}$$

Siendo I la corriente de ionización en presencia de la muestra, a la concentración c , en la cámara de detección, I_0 la corriente de ionización en el seno del gas portador puro, a una constante que depende de la geometría del detector y k una constante función de la afinidad electrónica de la muestra y del voltaje aplicado al detector.

La base operativa de este tipo de detectores consiste en la captura, por determinados compuestos químicos, de electrones lentos emitidos por la fuente radiactiva.⁶⁰ Si la suma de la energía cinética de la colisión más la desprendida en la formación de un ión negativo supera la energía-

de disociación de la molécula, tiene lugar el fenómeno de la captura electrónica, lo cual requiere una cierta afinidad de dicha molécula por los electrones libres. El carbono y el hidrógeno no poseen tal afinidad, por lo cual los hidrocarburos no capturan electrones (si bien existen excepciones); pero sí lo hacen con facilidad el oxígeno y los halógenos y, por ende, los hidrocarburos sustituidos con estos elementos, pareciendo relacionarse la afinidad electrónica de tales compuestos con la facilidad de disociación del heteroátomo. Así los éteres no presentan, o lo hacen muy débilmente, el fenómeno de la captura, mientras que los anhídridos y peróxidos sí; de igual modo, el cloro benceno, de halógeno no lábil, captura muy débilmente y el cloruro de bencilo, de halógeno lábil, con intensidad.

En virtud de tal fundamento teórico, el detector de captura electrónica puede quedar insensibilizado para ciertos tipos de moléculas, simplemente mediante la elevación del voltaje aplicado al mismo, hecho que determinará una reducción en la respuesta de los compuestos de débil afinidad y que puede llegar a hacerla igual a cero. En general, todos los miembros de una clase, como por ejemplo los ésteres, dejan de responder cuando se llega a un cierto potencial, mientras que los compuestos que, como los hidrocarburos clorados, capturan fuertemente, continúan respondiendo, fenómeno que proporciona, como antes se sugirió, una base para el desenmascaramiento de posibles estructuras susceptibles de interpretaciones erróneas y que son re

lativamente frecuentes en estudios de la naturaleza del---
que nos ocupa.

CONFIRMACION DE EPOXIDOS - No obstante lo limitado de su valor, se cita aquí un método que puede utilizarse para la confirmación de epóxidos, por el interés que en algunos casos concretos puede presentar para desenmascarar interfe_rencias susceptibles de ser confundidas con el dieldrín,-- compuesto que, como ya se ha comentado, aparece por regla general como metabolito del aldrín en gran número de micro organismos.

Una parte alícuota de 0,5 a 1 ml del extracto problema, en solución de hexano, se agita durante 5 minutos, a-- temperatura ambiente, con un volumen igual de ácido sulfúrico del 90·%, tratamiento que habrá hecho desaparecer los epóxidos existentes en la solución, incluido el dieldrín,-- al mismo tiempo que habrá dejado inalterados otros resi--- duos de naturaleza órganoclorada.

Decantada la fase orgánica y lavada varias veces con agua destilada para eliminar la acidez, se seca con sulfato sódico anhidro y se examina por CGL para constatar, y-- si procede cuantificar, las posibles alteraciones de la se_ñal atribuída al dieldrín.

Naturalmente que, al tratarse de una prueba planteada en forma negativa, mediante este tratamiento es posible de mostrar la no presencia de dieldrín en el extracto a deter

minar, pero no lo contrario, por lo que resulta de una utilidad bastante restringida.

1.5.3 - CENTELLEO LIQUIDO.

· Para las determinaciones efectuadas por este método,-- en aquellos casos en que se llevaron a cabo incubaciones-- con aldrín - C^{14} (actividad específica: 52 mCi / mmol),-- se utilizó un aparato Nuclear - Chicago, bicanal, en las-- condiciones de trabajo adecuadas para la operación con C^{14} . La composición de la solución de conteo utilizada es:

Dioxano.....	600 ml
Etilenglicol.....	250 "
Etanol absoluto.....	150 "
Naftaleno.....	60 g
PPQ.....	7 "
POPOP.....	0,25 g

1.6 - FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS: PURIFICACION- Y ESTUDIO DE LOS METABOLITOS.

Finalizados los periodos de incubación, de cada cultivo se obtiene, por los procedimientos que ya se han descrito, un extracto en un disolvente orgánico. Dicho extracto es susceptible de ser examinado por CGL, pudiendo tener lugar la detección de metabolitos no identificables de este modo, en cuyo caso resulta preciso un aislamiento de los mismos para su ulterior estudio por otros métodos.

De otro lado, no existe base alguna para asumir que la totalidad del insecticida que se adicionó al medio de cultivo se encuentra, al término de la incubación, en forma de compuestos solubles en disolventes orgánicos, existiendo, por el contrario, evidencias proporcionadas por diversos tipos de determinaciones cuantitativas, que señalan la existencia de uno o más productos de transformación del insecticida, de naturaleza hidrofílica. También en este caso se hace necesaria la separación y purificación de estos productos, ya que para su examen por métodos cromatográficos no es adecuado el medio acuoso donde se encuentran (en CGL por las limitaciones que al disolvente impone el detector de captura electrónica y en capa fina por las numerosas interferencias que se presentan) y tampoco es posible su transferencia a ninguno de los numerosos sistemas de di

solventes que, cumpliendo las condiciones de aptitud para el análisis cromatográfico, se ensayaron.

Así pues, para cada una de las necesidades que quedan apuntadas, se utilizó un determinado tipo de fraccionamiento por cromatografía en columna con colección de fracciones alícuotas del eluato.

1.6.1 - METABOLITOS SOLUBLES EN DISOLVENTES ORGANICOS.

La separación se lleva a cabo por cromatografía de adsorción sobre columna de Florisil activado (650° C / 2 horas), de 60 - 100 mallas: una columna de vidrio de 15 mm- de diámetro se rellena con el adsorbente hasta una altura de 65 cm, cuidando que el empaquetado resulte apretado y uniforme, y colocando en su extremidad superior una capa de alrededor de tres cm de espesor de sulfato sódico anhidro. Una vez añadida, concentrada hasta un volumen que no debe sobrepasar los 4 ml, la solución a tratar, se procede a la elución del sistema con arreglo a la secuencia que se indica: 100 ml de hexano, 350 ml de hexano - éter en cuatro volúmenes sucesivos con las siguientes proporciones de éter: 50 ml al 2 %, 100 ml al 5 %, 100 ml al 10 %, 100 ml al 50 % y, finalmente, 100 ml de éter puro.

El eluato se recoge en fracciones alícuotas de 10 ml- cada una y el proceso de separación se sigue mediante in--

yección de una muestra de cada alícuota en un aparato de--
CGL.

1.6.2 - METABOLITOS HIDROFILICOS.

Dadas las dificultades que presenta la localización--
de los metabolitos hidrofílicos por los métodos más conven--
cionales de detección, hubo de recurrirse al cultivo de---
aquellos microorganismos que en mayores proporciones los--
producían, en presencia de aldrín - C^{14} . Al término del pe--
riodo de incubación, se realiza una extracción exhaustiva--
con éter (hasta que un nuevo extracto etéreo no contenga--
ya radiactividad) del medio de cultivo, y la fase acuosa--
restante se concentra por liofilización hasta un volumen--
reducido. 2 ml de este concentrado se añaden a una columna
de 1,3 x 45 cm de Sephadex G - 25, previamente "hinchado"--
con agua destilada durante ocho horas, y la solución se---
eluye asimismo con agua destilada, coleccionándose el elua--
to en fracciones de 2 ml. De cada fracción se toma 1 ml---
que se añade a un vial con 13 ml de solución de conteo, a--
fin de determinar la distribución de la radiactividad en--
el eluato.

1.6.3 - ESPECTROS EN EL INFRARROJO.

Los metabolitos inidentificados por métodos cromato--
gráficos y de los cuales fue posible obtener una muestra--

de suficiente tamaño y pureza, fueron examinados por espectrofotometría IR, siguiendo, en líneas generales, la microtécnica descrita por J. T. Chen (1965)⁶³, ligeramente modificada, para la preparación de micropastillas adecuadas para operar con un condensador de haz: una lámina de papel de aluminio, con una perforación central de 1,5 mm de diámetro, se coloca sobre un cilindro de acero inoxidable y, con un embudo de vidrio "ad hoc" (tubo de aproximadamente 1,5 mm de diámetro interno), se deposita, en el centro de la lámina, un peso aproximado de 2 mg de BrK finamente pulverizado y perfectamente seco. Con una microjeringa se añaden alrededor de 2 μ l de una solución en hexano, puro y seco, de la muestra. De este modo, la solución impregnará el BrK y en escasos segundos se habrá evaporado el disolvente, momento en el cual el sistema se somete a una presión de alrededor de 5 Tm / cm² durante un minuto, transcurrido el cual la lámina de aluminio, en la que se habrá formado una ventana transparente de BrK sobre su perforación central, se retira de la prensa y se deposita en un desecador que contenga pentóxido de fósforo hasta su utilización.

Es conveniente, dado el acusado carácter higroscópico del BrK, que toda la operación se desarrolle en el menor espacio de tiempo posible.

El aparato empleado es un Perkin - Elmer modelo 225, provisto de una lente de BrK que condensa el haz hasta una sección de 2 mm². En estas condiciones es posible obtener espectros aceptables con cantidades de muestra del orden

de microgramos, siempre que la pureza sea elevada.

1.6.4 - ESPECTROS DE MASAS.

Fueron realizados, por cortesía de los Profesores F.-Korte y W. Klein (del Institut für Ökologische Chemie, --- München), en un aparato LKB 9000, que combina las técnicas de cromatografía de gases y espectrometría de masas.

P A R T E I I I

R E S U L T A D O S

Y S U

I N T E R P R E T A C I O N

1 - CARACTERISTICAS GENERALES DEL SUELO DE PROCEDEN-- CIA DE LOS MICROORGANISMOS ENSAYADOS.

Las muestras de suelo se tomaron, tal como se indica en la figura 9, en un punto centrado entre cuatro parcelas cuya composición, determinada por un método rápido, se da, en líneas generales, en la tabla IX. Ninguna de las parcelas había sido tratada con anterioridad con ningún tipo de producto plaguicida, formando todas ellas parte, precisamente, de una zona de la finca experimental destinada a la obtención de datos de control. La ausencia de residuos se comprobó, por otra parte, mediante análisis por CGL. El material retirado del suelo, que quedaba afectado hasta una profundidad de 20 cm, se sometía a un mezclado intenso an--

tes de proceder a la suspensión-- en agua de una parte alícuota del mismo para efectuar el aislamien-- to de microorganismos.

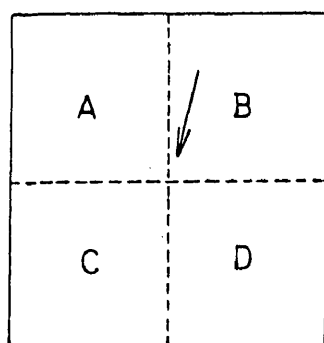


Fig. 9 - Loca--
lización del punto--
de muestreo.

Los recuentos microbiológi-- cos de mohos y Actinomicetos se-- llevaron a cabo siguiendo el méto-- do de las diluciones seriadas y-- utilizando en cada caso los me--- dios de cultivo recomendados por--

TABLA IX - Composición del suelo de procedencia de los microorganismos ensayados.

Profundidad afectada: 0 a 20 cm.

<u>COMPONENTES</u>	<u>PARCELAS</u>			
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>
Elementos gruesos.....	0	0	0	0
Textura.....	L Ac	L	Ac	L Ar
Materia orgánica (%).....	1,60	1,60	1,90	1,40
Reacción (pH).....	8,10	8,28	8,24	8,53
Carbonatos.....	3,5	7,5	4,5	7,5
<u>ELEMENTOS ACTIVOS (ppm)</u>				
Cloruros (Cl^-).....	40	50	40	30
Sulfatos ($\text{SO}_4^{=}$).....	I	I	I	I
Calcio (Ca^{++}).....	300	400	500	500
<u>ELEMENTOS EN RESERVA</u>				
Fósforo.....	8	8	8	6,5
Potasio.....	34	22	25	23

L: limosa; Ac: arcillosa; L Ac: limoarcillosa; L Ar: limo-arenosa; I: inapreciable.

TABLA X - Análisis microbiológico de las muestras de suelo (hongos y Actinomicetos).

Número total de hongos: $8,63 \cdot 10^5$ / g

Aspergillus ochraceus..... 35 %

" flavus

terreus 15 %

niger

Penicillium glaucum

" chrysogenum ... 15 %

Alternaria sp.

Fusarium sp. 35 %

Número total de Actinomicetos: $1,555 \cdot 10^6$ / g

Streptomyces albus..... 25 %

" aureus..... 15 %

" griseus..... 25 %

" pigmentados

en rojo..... 25 %

Otros Streptomyces..... 10 %

Pochon y Tardieux⁶⁴ y Pramer y Schmidt⁶⁵ para análisis de suelos, realizándose la incubación en estufa a 28° C durante 10 días.

En cuanto a los Actinomicetos, las identificaciones, basadas en su aspecto morfológico y el color de sus colonias, no pueden calificarse, a nivel de especie, más que de tentativas. Para la identificación de mohos se siguieron las clasificaciones de Henrici's⁶⁶ y de Schmidt,⁶⁷ deter--

minándose el color, tamaño, presencia o ausencia de septos hifales, forma y tamaño de las esporas y características y disposición de los órganos reproductores.

En la tabla X se da el análisis microbiológico de las muestras de suelo por lo que se refiere a hongos y Actinomicetos.

2 - LA UTILIZACION DE ALDRIN Y DIELDRIN POR LOS MICROORGANISMOS.

Las primeras series de resultados experimentales obtenidos evidenciaron, sin lugar a dudas, por una parte la ausencia de transformaciones de índole abiótica que incidan, en las condiciones utilizadas, sobre los insecticidas objeto de estudio; por otra, la incapacidad de todas las especies ensayadas para la utilización del aldrín o del diel--drín como fuentes de energía: ninguno de los cultivos en--los cuales figuraban estos insecticidas como única fuente--orgánica de carbono resultó viable después de un corto periodo de incubación, no siendo el inóculo capaz de desarrollarse ni de ejercer acción apreciable sobre los compues--tos órganoclorados adicionados al medio.

En apoyo de tales resultados viene, además, el hecho de que cuando los microorganismos se desarrollan en medios que contienen fuentes orgánicas de carbono adecuadas para su normal crecimiento, las transformaciones del insecticida tienen lugar únicamente durante la fase de crecimiento--exponencial del cultivo, cesando cuando la población del--mismo entra en fase estacionaria.

Tampoco las pruebas efectuadas con objeto de provocar

una forma endógena de metabolismo, alteraron la anterior-- conclusión: después del tratamiento más atrás descrito para estos casos, los cultivos involucionan, las transformaciones de los insecticidas que también se dan en circunstancias normales de crecimiento (con fuentes adicionales de carbono orgánico), progresan poco, tiene lugar una eliminación al medio de cultivo, en proporciones muy variables, del insecticida acumulado en el micelio (probablemente tal eliminación venga fundamentalmente determinada por la progresiva involución de la estructura hifal) y no se detecta ningún nuevo metabolito que pueda caracterizarse como típico de esta modalidad particular de cultivo.

Por otra parte, es de subrayar que tales resultados-- se producen, en términos cualitativos, de modo sustancialmente idéntico, independientemente de si se utiliza un inóculo habituado al medio de cultivo o no. La aceleración del proceso de transformación del insecticida, de todos modos muy poco significativa, que se aprecia cuando se utilizan inóculos habituados, resulta perfectamente explicable sobre la base de un acortamiento de la fase de latencia-- del cultivo, como un proceso de adaptación exclusivamente fenotípico, que no supone alteraciones del equilibrio mutación \longleftrightarrow retromutación + selección dentro del inóculo, ni por selección de mutantes espontáneos ni por acción mutagénica del insecticida, no produciéndose, por tanto, alteración alguna de las características hereditarias (adaptación genotípica) de los microorganismos predominantes--

en la población.

En efecto, ya se comentó anteriormente que numerosas comprobaciones efectuadas con la cepa originaria e incluso con cepas procedentes de Holanda, presentaron siempre idénticos comportamientos metabólicos, hecho difícil de explicar sobre la base de una adaptación genotípica.

Asimismo resulta plausible suponer que parecidos procesos de adaptación (a veces simplemente las "aceleraciones" anteriormente aludidas), señalados por otros autores en relación con el lindano⁶⁸ y el dieldrín,⁴³ pueden explicarse, sin necesidad de recurrir a alteraciones genéticas, en términos de una simple adaptación fenotípica a la "calidad" nutritiva del medio.

3 - CARACTERISTICAS DE LA TRANSFORMACION DEL ALDRIN Y EL DIELDRIN POR LOS MICROORGANISMOS.

Como ya en páginas anteriores se había adelantado, las estimaciones cuantitativas preliminares efectuadas por CGL sobre los extractos purificados de los cultivos que se llevaron a cabo, ponen de manifiesto, en principio, dos diferentes categorías de resultados:

1 - Aquellos que permiten asumir que sustancialmente todo el insecticida adicionado al medio de cultivo se encuentra, al término del periodo de incubación, en forma de compuestos susceptibles de ser extraídos mediante disolventes orgánicos y detectados, con mayor o menor facilidad, por CGL con sistema de detección de captura electrónica.

2 - Aquellos otros que, por el contrario, ponen de manifiesto que una parte importante de la cantidad inicial del insecticida utilizado en la incubación queda transformada en productos metabólicos que, o bien debido a su naturaleza hidrofílica permanecen en la fase acuosa después de la extracción del medio con disolventes orgánicos, o bien, aún habiendo sido extraídos de este modo, poseen una estructura que no permite su detección por CGL en las condiciones operatorias empleadas.

En este último supuesto, y ya que puede afirmarse que el hecho de la detección de residuos de insecticidas organoclorados es siempre factible por aquel método, la causa de su no detección podría deberse a una elución excesivamente lenta a través de la columna, o incluso a que quedasen totalmente retenidos por la fase estacionaria de la misma.

Dentro del primer grupo de resultados únicamente se encuentran los obtenidos con el *Penicillium glaucum* y que a continuación se pasa a detallar.

3.1 - EL METABOLISMO DEL ALDRIN POR *PENICILLIUM GLAUCUM*.

En los cultivos de *Penicillium glaucum* desarrollados en presencia de aldrín, el estudio por CGL de los extractos en disolventes orgánicos reveló la parcial transformación del insecticida en tres diferentes metabolitos, el menos polar de los cuales fue posible identificar con toda seguridad como dia Aldrín, a partir de su retención relativa en diversas condiciones operatorias. Los resultados de las pruebas efectuadas por cromatografía en capa fina, así como del método de confirmación de epóxidos, apoyaron asimismo tal conclusión. De los dos metabolitos restantes, para cuya identificación resultó insuficiente la información cromatográfica y que arbitrariamente fueron designados, en orden creciente de polaridades, M_1 y M_2 , el menos polar, es decir M_1 , parece producirse en proporciones sensiblemente superiores al de mayor polaridad (M_2), o, al menos, ello es lo que se deduce de las magnitudes relativas de sus señales cromatográficas.

Es interesante señalar que una gran parte de los resultados cuantitativos que se utilizan en el estudio de la transformación del aldrín por este hongo, proceden de la operación con cultivos sobre sustratos sólidos (medio M_4 - gelificado con agar; tabla VII), técnica que, al menos en este caso particular, se ha mostrado de gran eficacia, es-

pecialmente por el hecho de que la dinámica del proceso se manifiesta de un modo más acusado que en los cultivos en medio líquido. Ello unido a dos ventajas de carácter general, como son la posibilidad de fácil apreciación de posibles variaciones morfológicas relacionables con la presencia de insecticida, y la mayor semejanza de aquella modalidad de cultivo con las condiciones reales en que los microorganismos del suelo interactúan, en su sustrato natural, con los insecticidas, justifica la preferencia dada en esta especie a los ensayos sobre medio sólido, pese a constituir éste un método de trabajo aparentemente heterodoxo y prácticamente inexplorado en este campo de aplicaciones.

3.1.1 - RESULTADOS CROMATOGRÁFICOS.

La utilización de columnas unitarias de polaridad moderada en el estudio por CGL de los extractos en disolventes orgánicos que en el apartado anterior se aludían, conduce a la obtención de cromatogramas parcialmente resueltos, de los cuales constituyen ejemplos típicos los que se reproducen en la figura 10. Con valores óptimos para el caudal de gas portador resulta incluso difícil diferenciar las señales correspondientes a dieldrín y M_1 ; la reducción del caudal comporta una individualización ligeramente superior, pero no se logra una resolución aceptable antes de que la sensibilidad quede seriamente afectada, por lo que las columnas del tipo de la I (tabla VIII), se confirman como inadecuadas para la separación de estos dos productos.

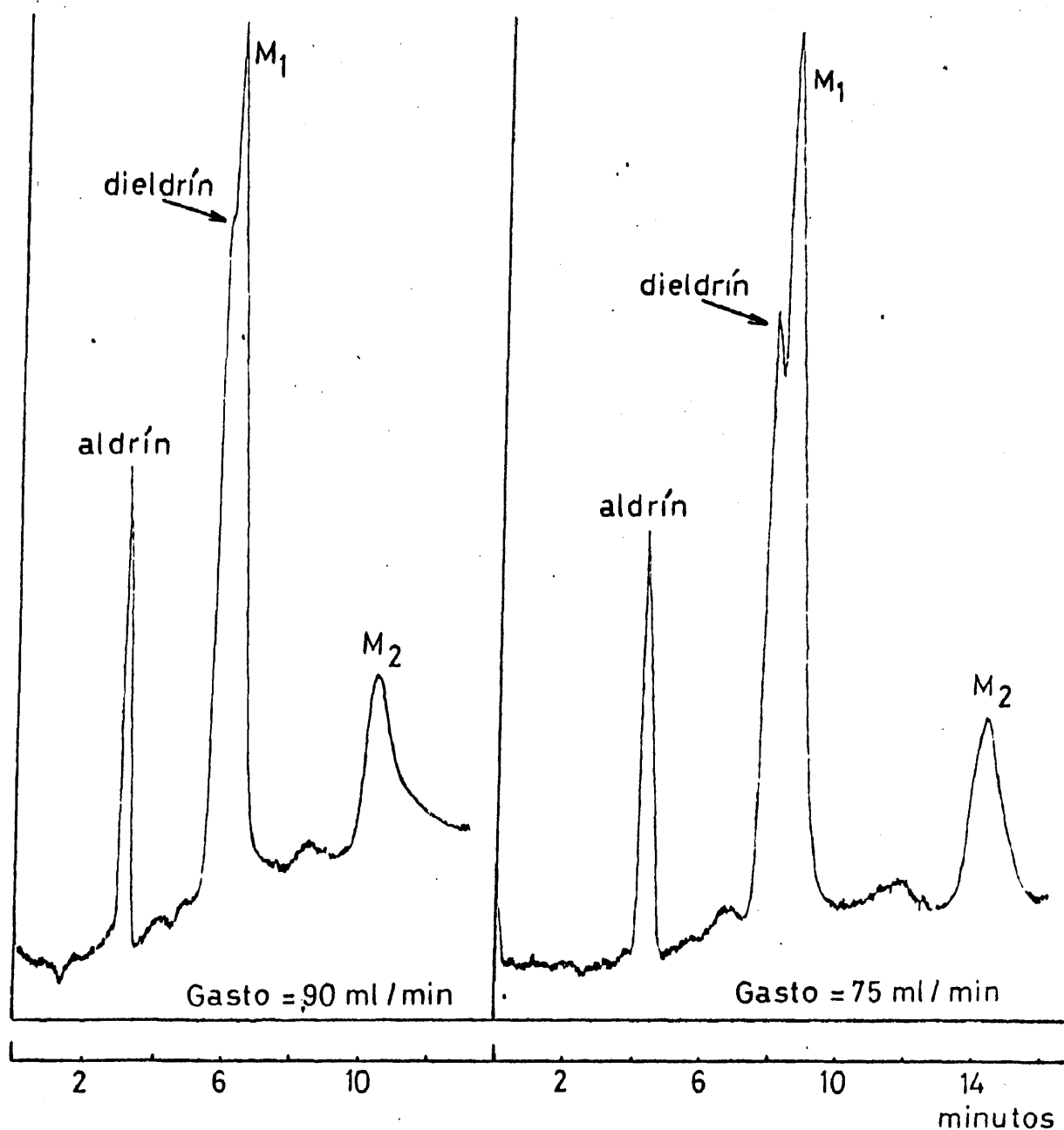


Fig. 10 - Cromatogramas de extractos de *P. glaucum*,-- en columna de DC - 200, a dos regímenes de caudal de gas-- portador.

Si se eleva la polaridad de la fase estacionaria (II, III, IV, V y VI; tabla VIII), llega a obtenerse, en ciertos casos, una neta resolución entre las señales producidas por el dieldrín y el M₁, si bien surge ahora el incon-

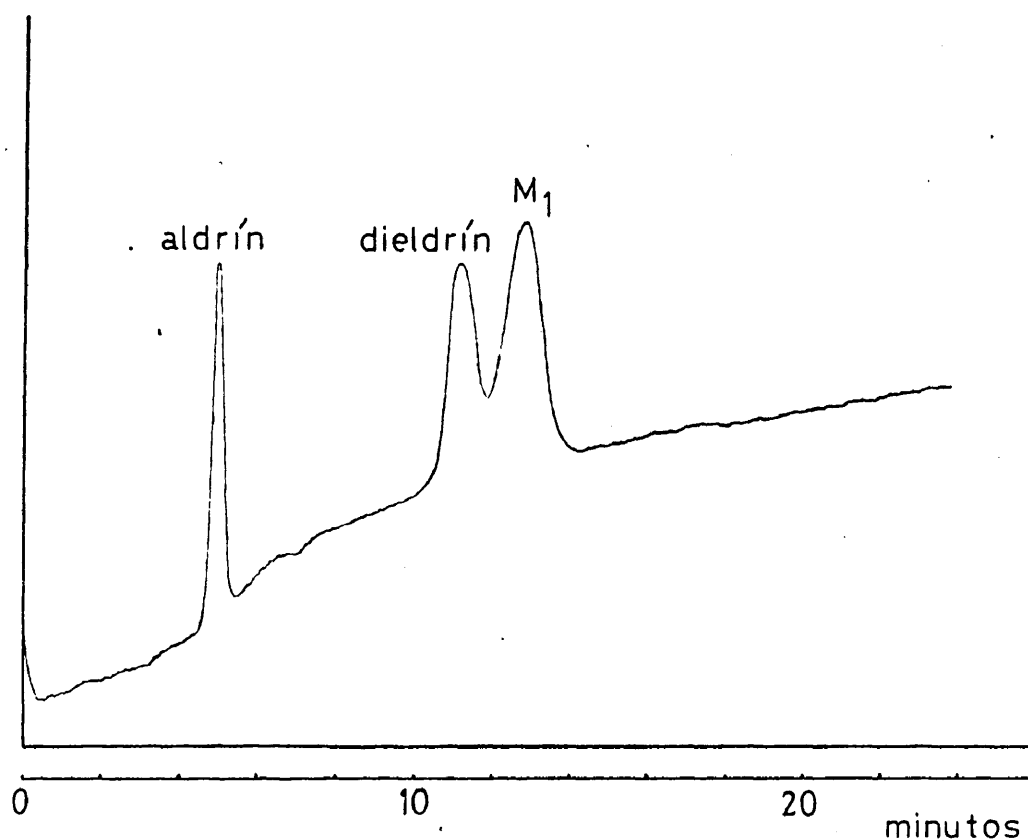


Fig. 11 - Cromatograma de extracto de *P. glaucum* obtenido mediante utilización de columna de QF - 1 y DC - 200, a carga elevada.

veniente de que se pierde la que origina el M_2 . Este fenómeno permite atribuir a este compuesto una fuerte polaridad, al menos notablemente más elevada que la de los otros dos metabolitos, ya que su comportamiento cromatográfico-- sugiere que queda totalmente retenido por la fracción polar de las fases estacionarias mixtas. Las figuras 11 y 12 ilustran este tipo de situaciones para las condiciones operativas II y V respectivamente.

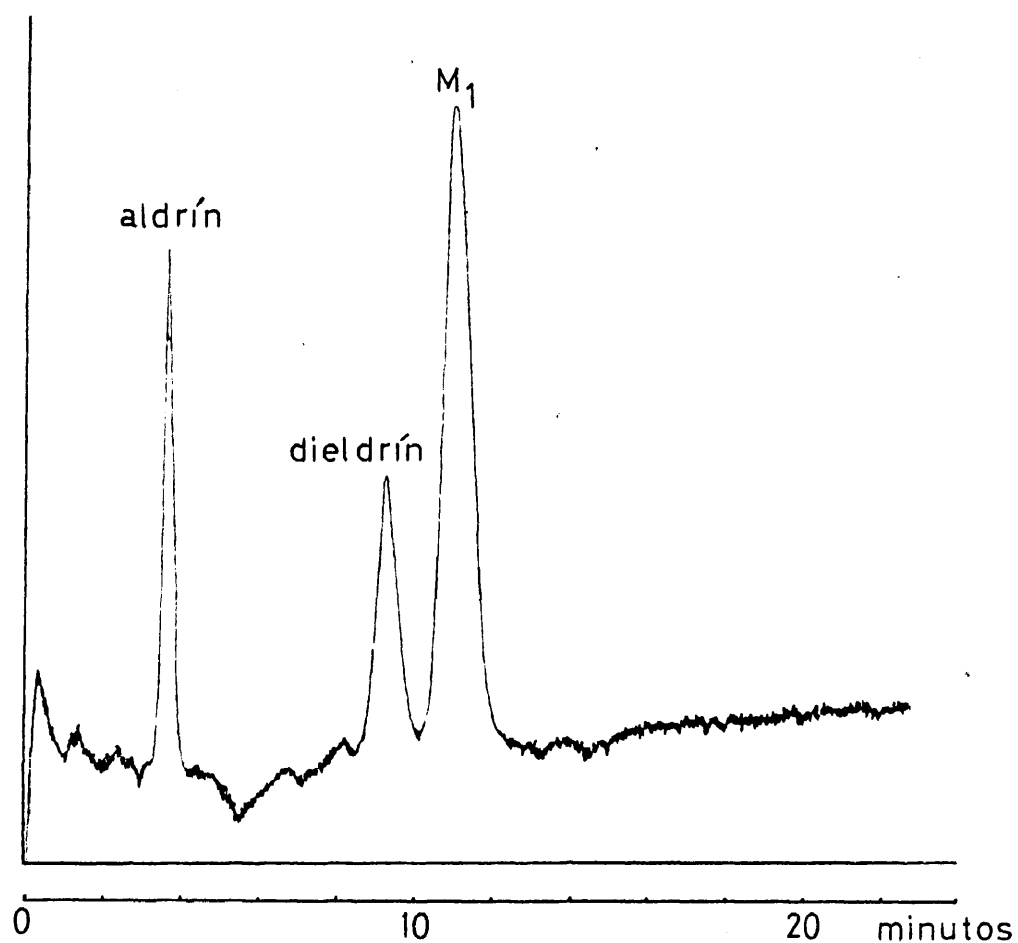


Fig. 12 - Cromatograma de un extracto de *P. glaucum*, - obtenido mediante utilización de una columna de Oronitapolibuteno - 128 y QF - 1.

3.1.2 - LAS VIAS DE TRANSFORMACION DEL ALDRIN. FACTORES QUE LAS AFECTAN.

En la totalidad de los ensayos efectuados, la transformación del insecticida que se adiciona al medio parece detenerse cuando el crecimiento del cultivo alcanza su fase estacionaria. Dada la riqueza de los inóculos utilizados, suele ser un buen criterio aproximativo para interrumpir

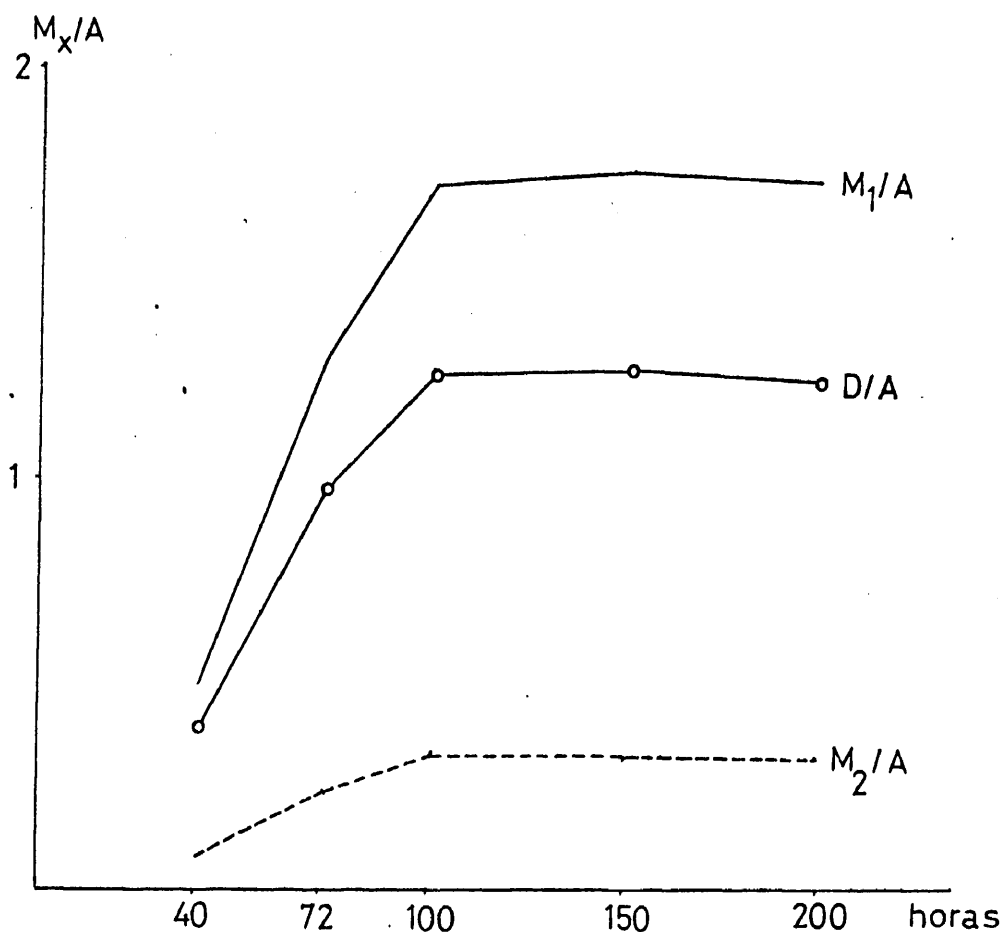


Fig. 13 - Variación con la edad del cultivo de la relación entre las superficies de las señales de aldrín y sus tres metabolitos (producidos por *P. glaucum*), en cromatogramas obtenidos en idénticas condiciones.

pir el desarrollo del microorganismo en el momento en que la transformación del aldrín haya alcanzado el máximo, hacerlo cuando el hongo se encuentre esporulado en toda la superficie de la placa, a lo cual acostumbra a llegarse,-- en las condiciones que se emplean referentes a la temperatura y naturaleza del sustrato, entre las 100 y las 150 horas.

En la figura 13, obtenida según resultados de una se-

rie de cultivos en medio sólido, y a una concentración inicial de aldrín equivalente a $0,08 \text{ ug / cm}^2$, se representa la variación a través del tiempo de las relaciones entre las superficies de las señales correspondientes al aldrín y sus tres metabolitos, en cromatogramas obtenidos en idénticas condiciones. Debe señalarse que, por ser desconocidos los compuestos M_1 y M_2 , no se dispone de soluciones de referencia, por lo que, para cuantificar los resultados, se ha recurrido al método (que no proporciona valores absolutos, pero sí estimaciones relativas perfectamente correctas) de relacionar superficies de señales obtenidas por inyección en idénticas condiciones de fracciones alícuotas de los extractos procedentes de los cultivos que se desea comparar.

A fin de determinar el origen de cada uno de los metabolitos detectados, se llevaron a cabo (una vez purificados por cromatografía de adsorción los componentes del extracto total) varias series de incubaciones del microorganismo en presencia de dieldrín y de M_1 aisladamente. Después de transcurrido un periodo de tiempo adecuado, pudo constatarse la recuperación total del insecticida en forma inalterada en el primer caso y la producción de M_2 , con parcial desaparición de M_1 , en los cultivos desarrollados en presencia de este compuesto.

Tales resultados permiten establecer que la transformación del aldrín como consecuencia de la acción del *P. glaucum*, transcurre a través de dos diferentes rutas meta-

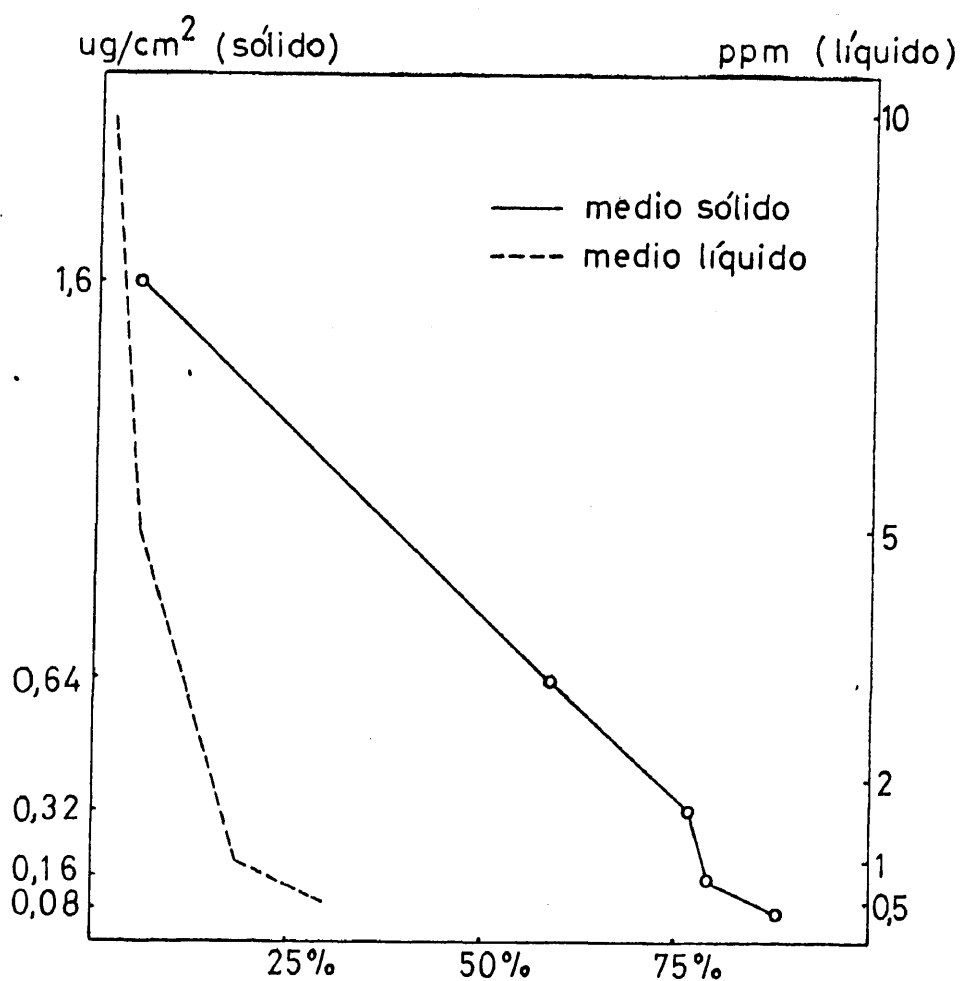


Fig. 14 - Transformación del aldrín por *P. glaucum*:-- en abscisas, % de transformación de aldrín; en ordenadas,-- concentración inicial del mismo (a la izquierda en medio-sólido y a la derecha en medio líquido).

bólicas: una que conduce exclusivamente a la formación de dieldrín, producto sobre el cual el microorganismo es incapaz de proseguir actuando, y otra que da como resultado la producción de M_1 , metabolito que, a su vez, se transforma parcialmente en M_2 .

Por otra parte, resulta digno de mención el hecho de-

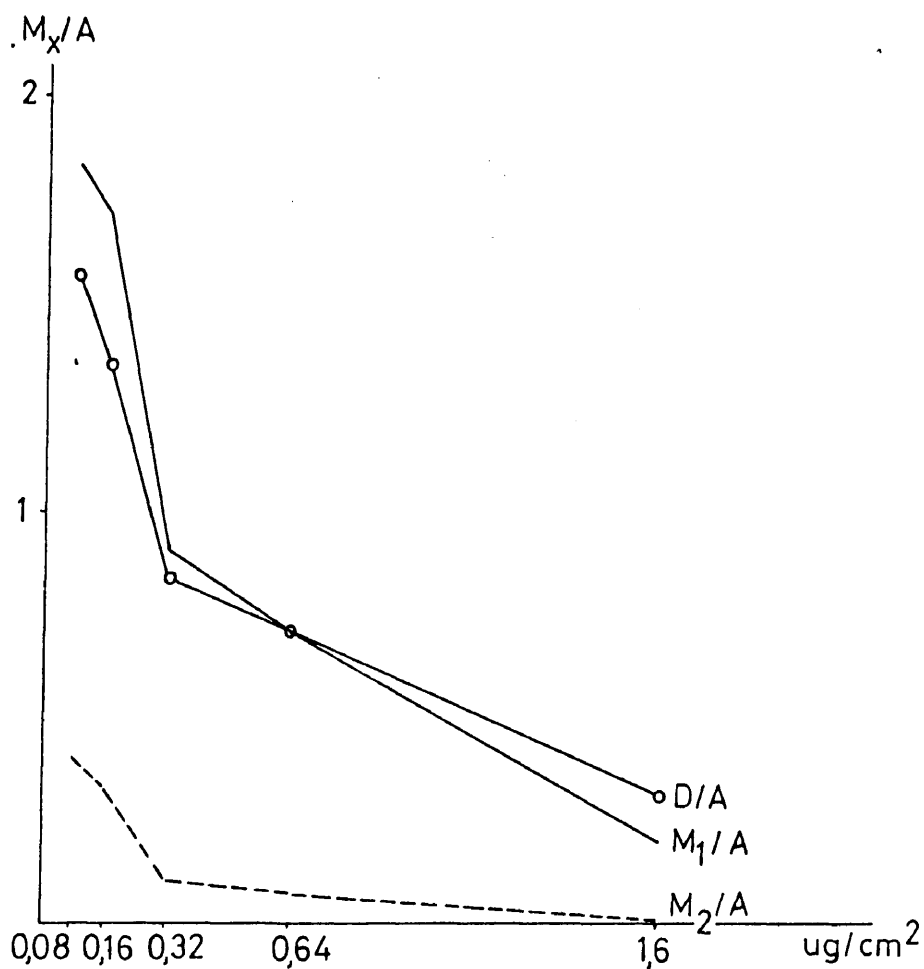


Fig. 15 - Variación de las relaciones entre las superficies de las señales de aldrín y sus tres metabolitos, con la concentración inicial de aquél. *P. glaucum* cultivado en medio sólido; tiempo aproximado de incubación: 120 horas.

que la concentración inicial de aldrín que se adiciona al sustrato, presenta dos importantes implicaciones en los aspectos cuantitativos del metabolismo de dicho insecticida:

La primera consiste en que el porcentaje de transformación del aldrín, determinado a partir de la relación aldrín añadido / aldrín recuperado y teniendo en consideración el factor de recuperabilidad establecido en ensayos--

previos, decrece de modo regular y ostensible a medida que aumenta la concentración inicial de insecticida en el medio, resultado que, como era de esperar, se pone de manifiesto de modo paralelo en cultivos sobre sustratos sólidos y líquidos, aunque con diferentes valores absolutos en cada uno de ellos (figura 14).

La segunda reside en el hecho de que tal concentración inicial determina la dirección dominante del metabolismo del insecticida. En efecto, como queda reflejado en la figura 15, mientras que a bajas concentraciones de aldrín su descomposición tiene lugar esencialmente por la segunda de las vías antes citadas, apareciendo el compuesto M_1 como metabolito mayoritario, a medida que la concentración del insecticida se eleva, tal predominio decae en favor del mecanismo de epoxidación, hasta que se llega a un punto en el que el dialdrín se presenta como resultado principal de la acción metabólica. En ninguna de las condiciones experimentales ensayadas presenta el compuesto M_2 una importancia cuantitativa semejante a la de los dos anteriores metabolitos.

3.1.3 - PURIFICACION DE LOS METABOLITOS Y ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LOS MISMOS.

El fraccionamiento de las soluciones conteniendo la mezcla de aldrín intransformado y los metabolitos originados por la acción del hongo sobre el insecticida, se lleva

a cabo fundamentalmente mediante cromatografía de adsorción en columnas de Florisil, siguiendo la metodología descrita en páginas anteriores. Los resultados de una elución típica se esquematizan en la figura 16.

La separación del aldrín resulta fácil, ya que eluye--arrastrado por el hexano, en las primeras fracciones. Tampoco ofrece dificultades la obtención de soluciones de M_2 de pureza aceptable, lo cual ocurre en las fracciones finales, cuando el eluyente contiene éter en proporciones elevadas. No sucede lo mismo con el dieldrín y el M_1 , que eluyen casi conjuntamente en las fracciones intermedias, no--habiéndose logrado una resolución completa con ninguno de los diversos sistemas de eluyentes que se ensayaron. Ello obliga a la utilización de columnas de cierta longitud y a la repetición del proceso con la solución que contiene ambos productos. Cuando se utiliza Florisil parcialmente desactivado por adición del 1 - 3 % (p / v) de agua desionizada, el orden de elución tiende a invertirse para estos--dos compuestos, pero resulta más eficaz el empleo del adsorbente activo.

Las diversas técnicas de cromatografía en capa fina--que por otra parte se ensayaron, fueron asimismo de poca--eficacia en la separación de dieldrín y M_1 .

Los métodos de reparto, en especial el que se realiza con hexano / acetonitrilo, contribuyen, antes y después del desarrollo de la técnica cromatográfica, a la purifica

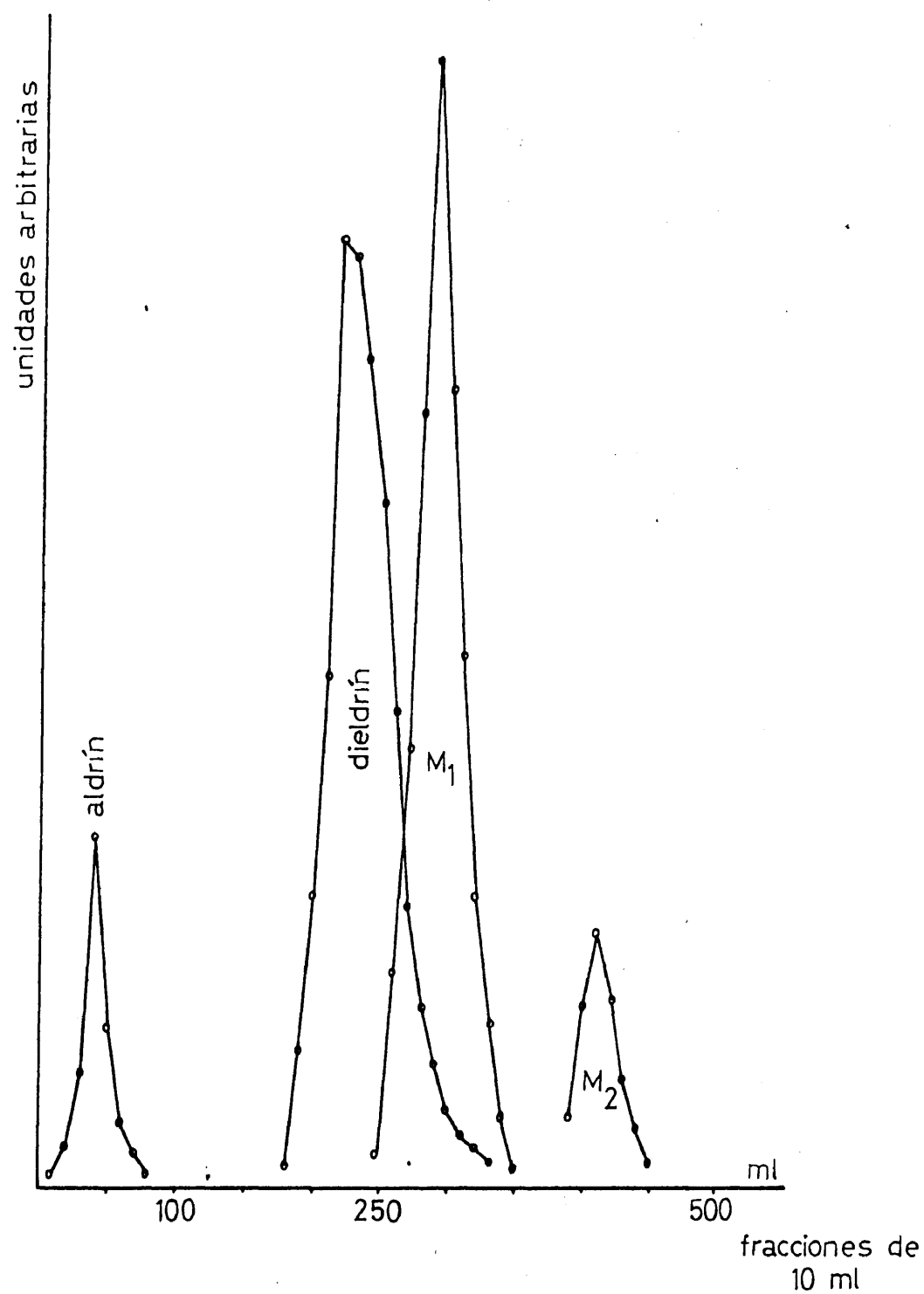


Fig. 16 - Separación de los metabolitos del aldrín producidos por *P. glaucum*, mediante cromatografía de adsorción sobre Florisil.

ción de las soluciones objeto de tratamiento, si bien es preciso tener en cuenta que la elevada polaridad del metabolito M_2 puede determinar graves pérdidas del mismo, al ser arrastrado en proporciones relativamente considerables por la fase final de acetonitrilo - agua. Tanto es así, que cuando el método de reparto es posterior a la separación cromatográfica, la ulterior extracción de dicha fase con éter permite recuperar, en estado de relativa pureza, cantidades importantes de aquel compuesto.

La colección, pues, de los compuestos problema M_1 y M_2 en las proporciones y grado de pureza necesarias para que pueda iniciarse su estudio estructural, implica una metodología tediosa y en la que se opera con bajos niveles de rendimiento. Como, por otra parte y según se ha visto, las condiciones óptimas para la producción de tales compuestos se encuentran a bajas concentraciones iniciales de aldrín, la obtención de alrededor de 500 ug de M_1 con una pureza superior al 95 % exige la manipulación de no menos de 300 placas Petri de 9 cm de diámetro. El intento de producción en proporciones más masivas, mediante incubaciones en medio líquido y utilizando un fermentador a escala de planta - piloto, de 20 litros de capacidad, dio, como suele ocurrir en los cultivos microbiológicos cuando se elevan los volúmenes de trabajo sin un completo estudio previo de los parámetros de la experiencia, resultados claramente insatisfactorios.

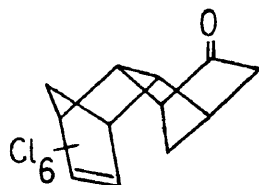
El estudio estructural de los metabolitos aislados y-

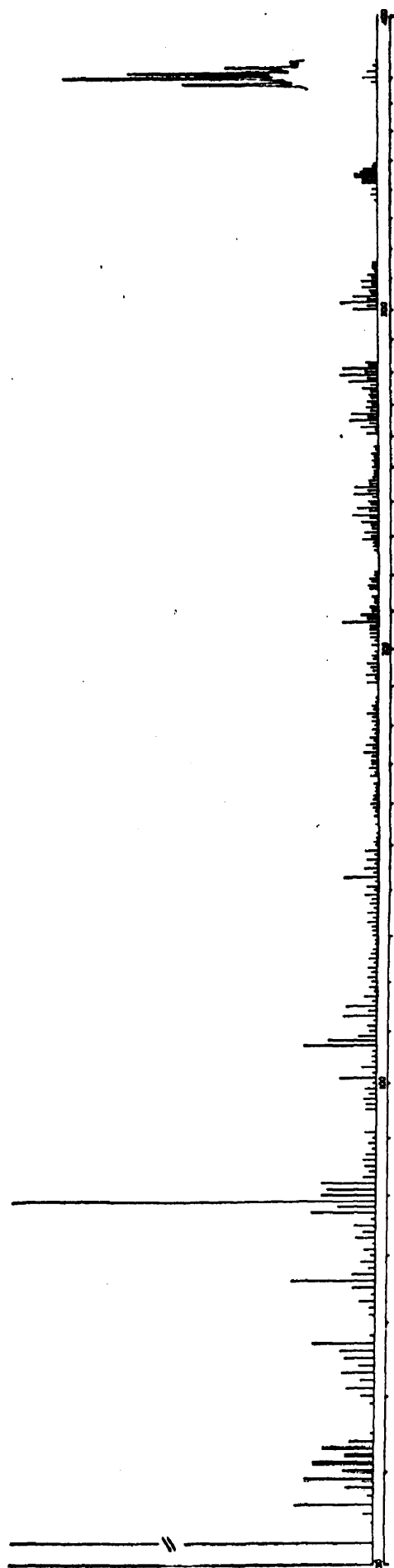
purificados, se llevó a cabo por las microtécnicas ya descritas aplicadas a la espectrofotometría IR y a la espectrometría de masas.

Con respecto al M_1 , el espectro IR, que no se reproduce por su baja calidad, únicamente evidenció una mal definida banda, probablemente carbonílica, e indicios de otra, a 1600 cm^{-1} , típica de los compuestos ciclodiénicos con doble enlace clorado.

El espectro de masas (figura 17), puso de manifiesto un valor de $m / e = 378$ para el ión molecular, que por otra parte mostró en su agrupación isotópica la presencia, claramente definida, de 6 átomos de cloro. El pico base a $m / e = 79$ sugiere una fragmentación análoga a la que tiene lugar en el dieldrín,^{69,70} así como el grupo isotópico debido a 5 átomos de cloro y correspondiente a un valor $m / e = 261$, probablemente determinado por el ión $C_7H_2Cl_5$, originado en una descomposición retro Diels - Alder.

El dato más definitivo lo suministra la comparación del espectro de M_1 con el del compuesto (X, figura 3)--supuestamente de la misma estructura (figura 18), obtenido por síntesis y que resulta esencialmente idéntico al anterior, debiéndose ciertas pequeñas discrepancias a la presencia de impurezas de dieldrín en la solución de M_1 , al cual, por tanto, puede asignársele la estructura de ce toaldrín:





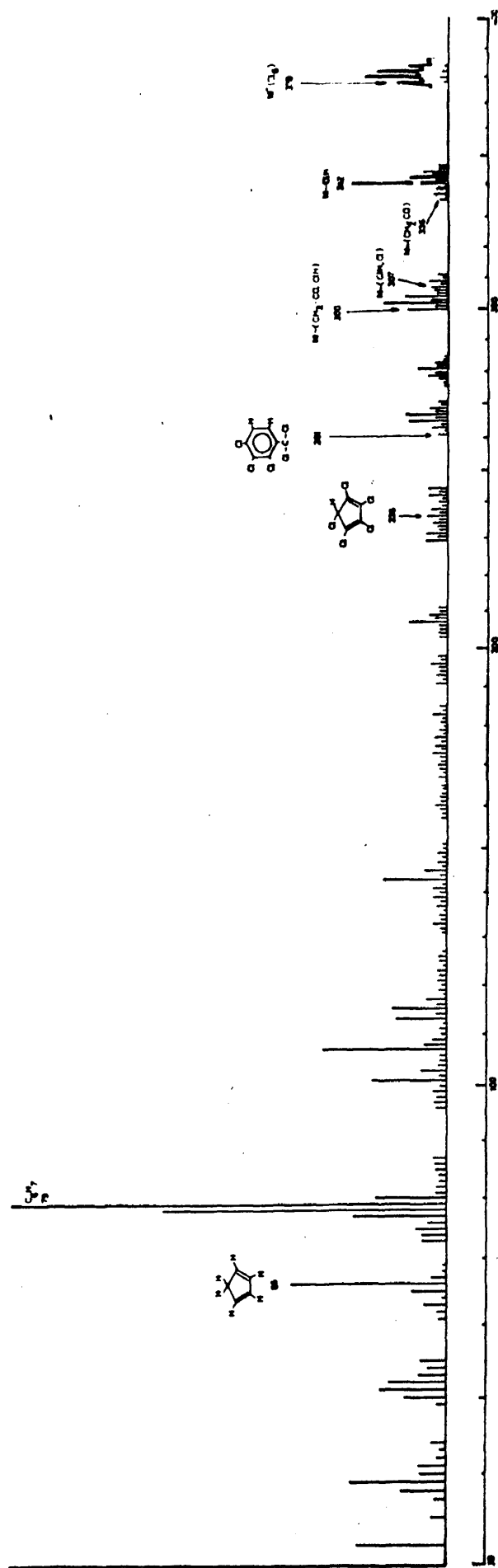


Fig. 18 - Espectro de masas de cetoaldrín obtenido por síntesis.

Esta hipótesis resulta, por otra parte, concordante-- con ciertos aspectos de su comportamiento cromatográfico-- (CGL), consistentes en una ligera disminución de su constante de respuesta con la elevación del voltaje aplicado-- al detector y que, como se ha comentado al tratar de las-- variaciones en la afinidad electrónica de diversas especies químicas, son susceptibles de ser explicadas sobre la base de una pérdida de respuesta por parte del grupo cetónico.

Por lo que se refiere a la identidad del metabolito-- M_2 , que no fue posible purificar más que en proporciones-- sensiblemente más reducidas que el anterior, y que en el-- IR mantenía una banda semejante a la supuestamente carbónica que exhibía el M_1 , no se puede adelantar ninguna hipótesis estructural. El hecho de su procedencia a partir-- del cetoaldrín a través de un mecanismo que, por los indicios, fácilmente podría ser considerado como una vía oxidativa que transcurriese en dos etapas sucesivas, así como-- su característico comportamiento durante el proceso de su purificación por los métodos de reparto y su análisis cromatográfico en columnas de fase mixta, parecen sugerir una estructura posiblemente acídica.

Resulta interesante destacar que en la única referencia que conocemos en relación con el cetoaldrín considerado como residuo ciclodiénico derivado de una acción metabólica, dicho compuesto es tratado (F. Matsumura et al.,⁷¹--- 1968), conjuntamente con el aldrín y otros productos de--

transformación, como un metabolito del dieldrín, con arreglo al esquema:



Nuestros resultados, que dejan fuera de toda duda la formación del cetoaldrín de un modo directo a partir del--aldrín, permiten aventurar una diferente interpretación de la anterior secuencia:



3.2 - METABOLISMO DEL ALDRIN CUANDO SE FORMAN PROPORCIONES IMPORTANTES DE METABOLITOS HIDROFILICOS.

Así como en los cultivos de *P. glaucum* desarrollados en presencia de aldrín, el examen por CGL de los extractos obtenidos en disolventes orgánicos conduce a la detección de tres metabolitos, en el resto de los microorganismos en sayados y sometidos a una manipulación enteramente análoga (con la única diferencia de que las incubaciones se llevaron a cabo en medio líquido, con agitación continua), el mismo método analítico únicamente evidencia la presencia de dieldrín, además de proporciones variables de aldrín in transformado.

En todos estos casos, por otra parte, las estimaciones cuantitativas que, apoyadas en los datos cromatográficos, se efectuaron, indican, teniendo en cuenta las recuperabilidades halladas para el aldrín y el dieldrín, que las cantidades detectadas no totalizan el aldrín inicialmente adicionado a los cultivos.

De las dos posibilidades - presencia de metabolitos hidrofílicos no susceptibles de ser extraídos de los medios acuosos por reparto con disolventes orgánicos, o bien existencia de metabolitos que, aun extraídos, no fuesen detectables -, que páginas más atrás se habían sugerido como explicación de tal fenómeno, pudo confirmarse la primera--

de ellas cuando, después de la incubación de determinadas especies en estas circunstancias, en medios portadores de aldrín - C^{14} , se constató la permanencia de una apreciable radiactividad en la fase acuosa después de una enérgica extracción con éter.

De otro lado, es fácil establecer que la estructura precursora del compuesto (o compuestos) hidrofílicos es el aldrín y no el dieldrín, ya que cuando las mismas especies se desarrollan en presencia de este último insecticida, al término del periodo de incubación se recupera intacta la totalidad del dieldrín.

Ninguno de los numerosos y variados métodos de extracción probados lograron disminuir de modo significativo la radiactividad de la fase acuosa, por lo cual, utilizando la procedente de un cultivo de *Aspergillus niger* después de concentrada por liofilización, se llevó a cabo una cromatografía de gel - filtración a través de una columna de Sephadex G - 25 ("medium") en las condiciones que ya se describieron.

Los resultados del conteo, verificado por centelleo líquido, de las alícuotas en que se fraccionó el eluato, quedan esquematizados en la figura 19. Después de determinar las correcciones debidas al efecto de extinción (quenching), y que fueron calculadas por conteo de una cantidad conocida de aldrín - C^{14} distribuída entre las alícuotas obtenidas a partir de un cultivo en blanco de *A. niger*,

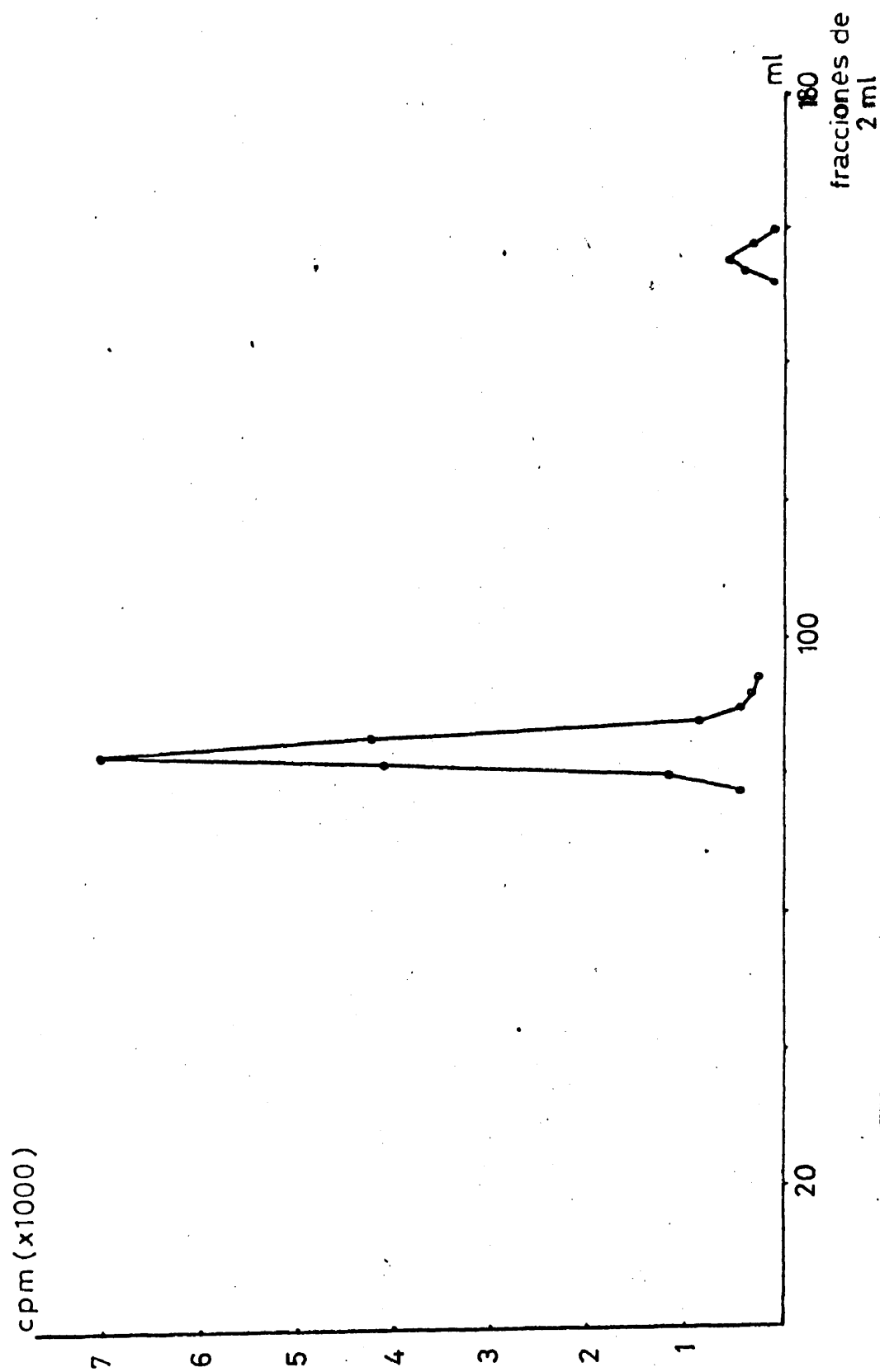


Fig. 19 - Separación, por cromatografía de gel - filtración a través de Sephadex G - 25, de los metabolitos hidrofílicos producidos por *A. niger* a partir de aldrín - C14.

por un método enteramente igual al seguido para el cultivo con aldrín - C^{14} , se encontró que sustancialmente toda la radiactividad en forma hidrosoluble se hallaba repartida en dos máximos perfectamente resueltos, evidentemente correspondientes a dos metabolitos, uno de los cuales aparecía en proporciones notablemente mayoritarias.

Es de señalar que las estimaciones cuantitativas obtenidas por CGL acerca de las proporciones globales en que tales metabolitos se formaban, resultaron sensiblemente coincidentes con las calculadas a partir de los datos suministrados por las experiencias con aldrín - C^{14} .

Sobre la naturaleza de los metabolitos hidrofílicos caben, en principio, dos hipótesis estructurales de carácter general:

1 - Puede tratarse de productos de transformación del aldrín originados por alguna forma de metabolismo oxidativo que haya conducido a la aparición de agrupaciones que les confieran elevada polaridad, tales como - OH glicólicos o grupos carboxílicos.

2 - Pueden consistir en estructuras conjugadas a base de un derivado moderadamente hidrofílico del aldrín y algún componente fúngico de elevada hidrofilia.

Entre los productos del metabolismo de los insecticidas ciclodiénicos se conocen, al menos como ya se ha vis--

to, en animales superiores, estructuras que responden a--- los dos tipos mencionados. No se dispone de una informa--- ción tan completa por lo que se refiere a los microorganismos, si bien es plausible suponer la existencia de mecanismos semejantes.

Con objeto de obtener información a este respecto, se ensayó un tratamiento hidrolítico con aquellas fracciones en las cuales se habían localizado los máximos de radiactividad. Para ello, 1 ml de cada una de ellas se mantuvo a--- reflujo con un volumen equivalente de NaOH 1,5 N durante--- 60 minutos. No obstante constituir un tratamiento que parece suficientemente enérgico como para determinar la ruptura de un posible conjugado, una ulterior extracción con éter de la solución acuosa, prosigue sin eliminar de la---

LEYENDA QUE INTRODUCE A LAS TABLAS XI A XV

T - Trazas

(A)₀ - Concentración inicial de aldrín

(A)_t - " de aldrín una vez finalizado el periodo de incubación

(D)_t - Concentración de dieldrín al término del periodo de incubación

% A D - % de aldrín transformado en dieldrín

% A H - " " " " " metabolitos de--- naturaleza hidrofílica

Micelio/ medio - Relación entre concentraciones de insecticida halladas en micelio y medio. Representa una estimación de la acumulación activa de insecticida.

TABLAS XI. a y XI. b - Datos cuantitativos sobre la transformación del aldrín en cultivos de *Penicillium chrysogenum* en medio líquido.

(A) ₀ medio (ppm)	pH final	(A) _t (ppm)		(D) _t (ppm)	
		medio	micelio	medio	micelio
0,5	7,8	0,0018	75,4	0,004	23,83
1	8	0,006	135,4	0,007	42,97
2	8,1	0,014	167,0	0,016	36,58
5	8,3	0,037	550,0	0,012	50,00
10	8,5	0,32	1480,5	0,019	24,27

XI. b

(A) ₀ medio (ppm)	% de aldrín transformado	% A D	% A H	micelio / medio	
				ald.	diéd.
0,5	67,3	11,1	56,2	41922,2	5957,5
1	70,3	9,7	60,5	22578,3	6138,5
2	82,1	4,5	77,5	11933,5	2286,2
5	77,2	2,2	75,0	14864,8	4166,6
10	73,8	0,5	73,3	4626,8	1277,3

TABLAS XII. a y XII. b - Datos cuantitativos referentes a la transformación del aldrín en cultivos de *Aspergillus*---*ochraceus* en medio líquido.

(A) ₀ medio (ppm)	pH final	(A) _t (ppm)		(D) _t (ppm)	
		medio	micelio	medio	micelio
0,5	8	T	3,3	0,06	84,9
1	8	0,008	16	0,15	136
2	8	0,04	76	0,25	226
5	8	0,09	775	0,23	825,1
10	8,6	3,37	2840	0,07	45,8

XII. b

(A) ₀ medio (ppm)	% de aldrín transformado	% A D	% A H	micelio / medio	
				ald.	diel.
0,5	98,5	50,1	48,3	-	1416
1	95,6	45,7	49,9	2000	906
2	90,1	35,6	54,5	1900	904
5	61,5	38,6	21,9	8600	3586
10	20,7	1,7	19,0	842,7	654,7

TABLAS XIII. a y XIII. b - Datos cuantitativos referentes a la transformación del aldrín en cultivos de *Aspergillus-niger* en medio líquido.

(A) ₀ medio (ppm)	pH final	(A) _t (ppm)		(D) _t (ppm)	
		medio	micelio	medio	micelio
0,5	6,5	T	5,1	0,005	75,28
1	6,5	0,0006	12,5	0,015	146,15
2	6,5	0,001	34,1	0,037	398,29
5	7	0,011	222,3	0,081	502,19
10	7,5	0,09	809,7	0,17	642,35

XIII. b

(A) ₀ medio (ppm)	% de aldrín transformado	% A D	% A H	micelio / medio	
				aldrín	dield.
0,5	97,3	40,5	56,8	-	15456,0
1	96,6	39,5	57,1	20833,7	9743,3
2	96,2	45,6	50,5	34090,0	10764,5
5	87,1	30,2	56,8	20214,5	6199,8
10	84,7	13,1	71,6	8996,7	3778,5

TABLAS XIV. a y XIV. b - Datos cuantitativos sobre la transformación del aldrín en cultivos de *Aspergillus terreus* en medio líquido.

(A) ₀ medio (ppm)	pH final	(A) _t (ppm)		(D) _t (ppm)	
		medio	micelio	medio	micelio
0,5	7,5	T	4,80	0,022	112,20
1	7,5	0,005	20,99	0,132	138,95
2	7,5	0,012	20,32	0,205	229,16
5	7,5	0,031	716,88	0,196	454,48
10	7,8	0,070	1962,06	0,037	544,15

XIV. b

(A) ₀ medio (ppm)	% de aldrín transformado	% A D	% A H	micelio / medio	
				aldrín	dield.
0,5	97,8	54,3	43,5	-	5100,0
1	94,8	43,6	51,2	4198,0	1068,8
2	77,5	34,8	42,7	1693,3	1117,8
5	68,5	23,4	45,0	23125,1	2318,7
10	59,5	11,3	48,4	28029,4	14706,7

TABLAS XV. a y XV. b - Datos cuantitativos referentes a la transformación del aldrín en cultivos de *Aspergillus flavus* en medio líquido.

(A) ₀ medio (ppm)	pH final	(A) _t (ppm)		(D) _t (ppm)	
		medio	micelio	medio	micelio
0,5	7,5	0,0014	28,6	0,010	49,6
1	7,5	0,008	77,2	0,02	110,8
2	7,5	0,02	207,7	0,03	196,8
5	7,5	0,05	898,2	0,02	187,6
10	7,5	0,25	1769,6	0,13	641,1

XV. b

(A) ₀ medio (ppm)	% de aldrín transformado	% A D	% A H	micelio / medio	
				ald.	dield.
0,5	85,1	27,3	57,7	20442,8	4964,0
1	79,6	30,3	49,2	9652,5	5544,5
2	73,6	25,4	48,1	10387,5	6562,3
5	53,8	9,9	43,9	17964,0	9381,0
10	65,9	12,7	53,1	7078,6	4932,1

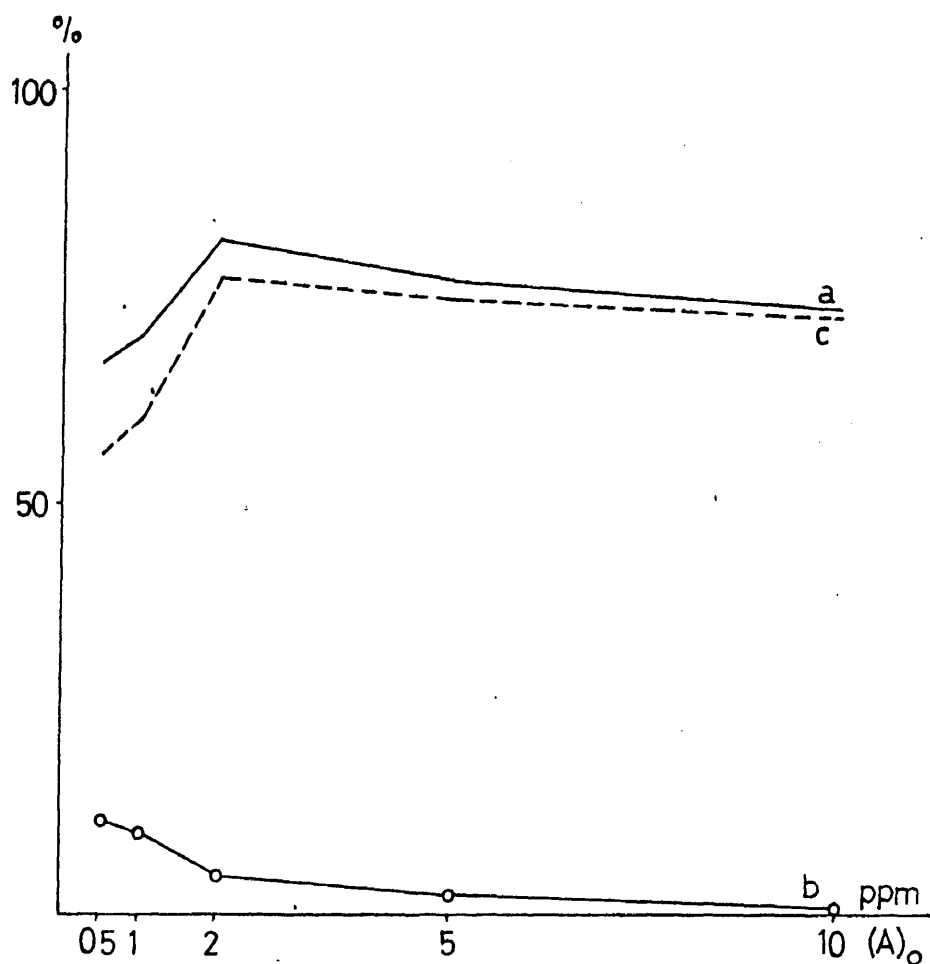


Fig. 20 - Variaciones en el metabolismo del aldrín--- por *Penicillium chrysogenum*, según la concentración inicial de aquel insecticida.

a: % de aldrín transformado (total)
 b: % " " " en dihidroaldrín
 c: % " " " " productos hidrofílicos

misma proporciones significativas de radiactividad, lo--- cual es posible tomar como un indicio a favor de la primera hipótesis estructural. Tampoco el extracto etéreo produjo ninguna señal cuando fue examinado por CGL.

Tal vez el aspecto más notable que puso de manifiesto la cuantificación del proceso de transformación del aldrín

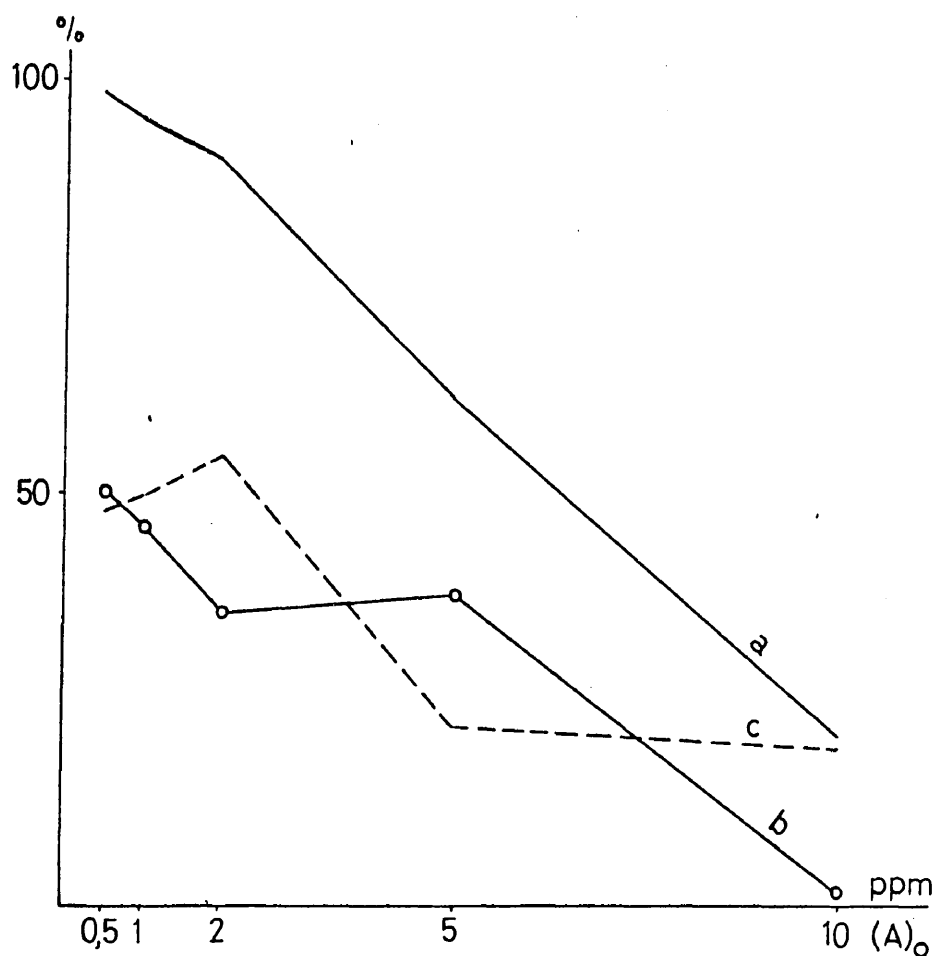


Fig. 21 - Variaciones en el metabolismo del aldrín---por *Aspergillus ochraceus*, según la concentración inicial de aquel insecticida.

- a: % de aldrín metabolizado (total)
 b: % " " transformado en dieldrín
 c: % " " " " productos hidrofílicos

en esta serie de experiencias fue, como en el caso del *Penicillium glaucum*, la influencia de la concentración inicial de aldrín en las características de tal proceso. En las tablas XI. a y b, a XVI. a y b, se recogen los valores medios (obtenidos a partir de no menos de cinco series de cultivos), de una serie de parámetros que pueden considerarse como indicadores fundamentales del desarrollo de la transformación metabólica experimentada por el aldrín, y--

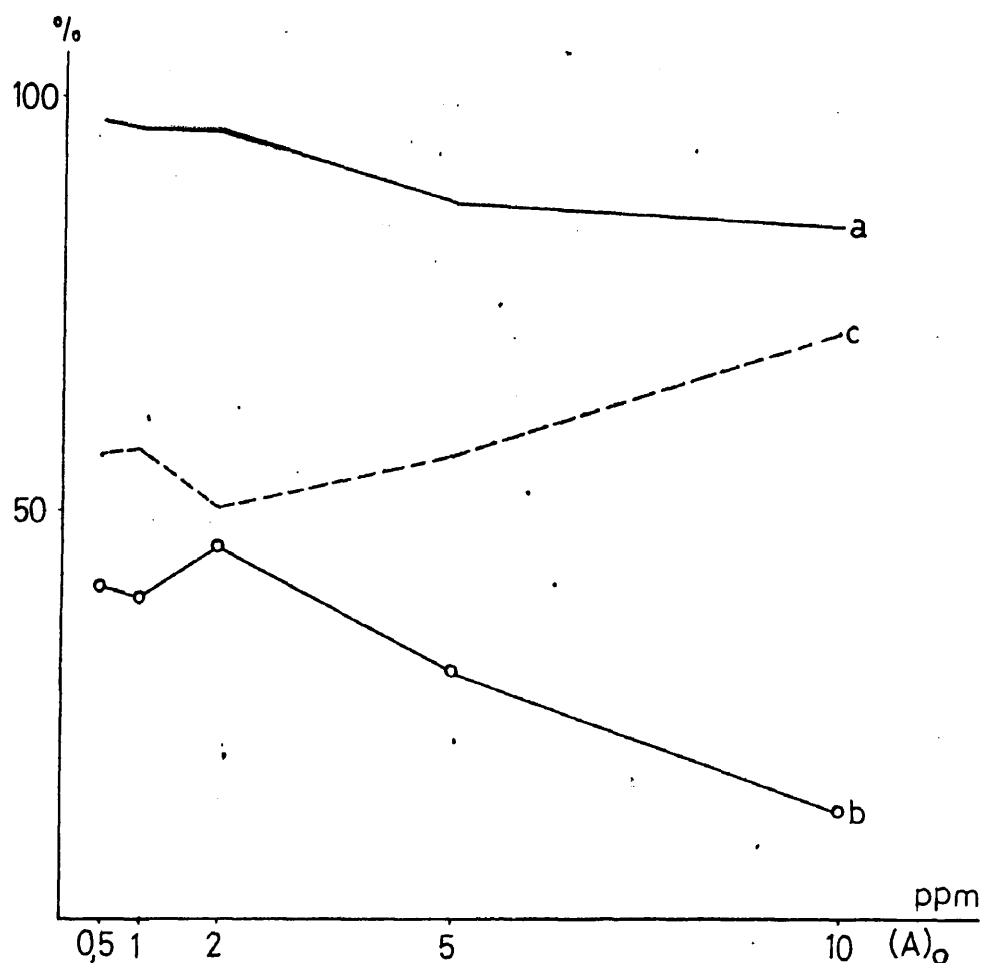


Fig. 22 - Variaciones en el metabolismo del aldrín--- por *Aspergillus niger*, según la concentración inicial de--- aquel insecticida.

a: % de aldrín transformado (total)
b: % " " " en diethyl ether
c: % " " " " productos hidrofílicos

tales valores, en efecto, acusan determinadas tendencias-- que no pueden ser atribuídas a la fluctuación estadística-- de los resultados.

Por lo que se refiere al porcentaje de aldrín que se-- transforma después de un periodo de 30 días (tiempo duran-- te el que, como término medio, se prolonga la incubación),

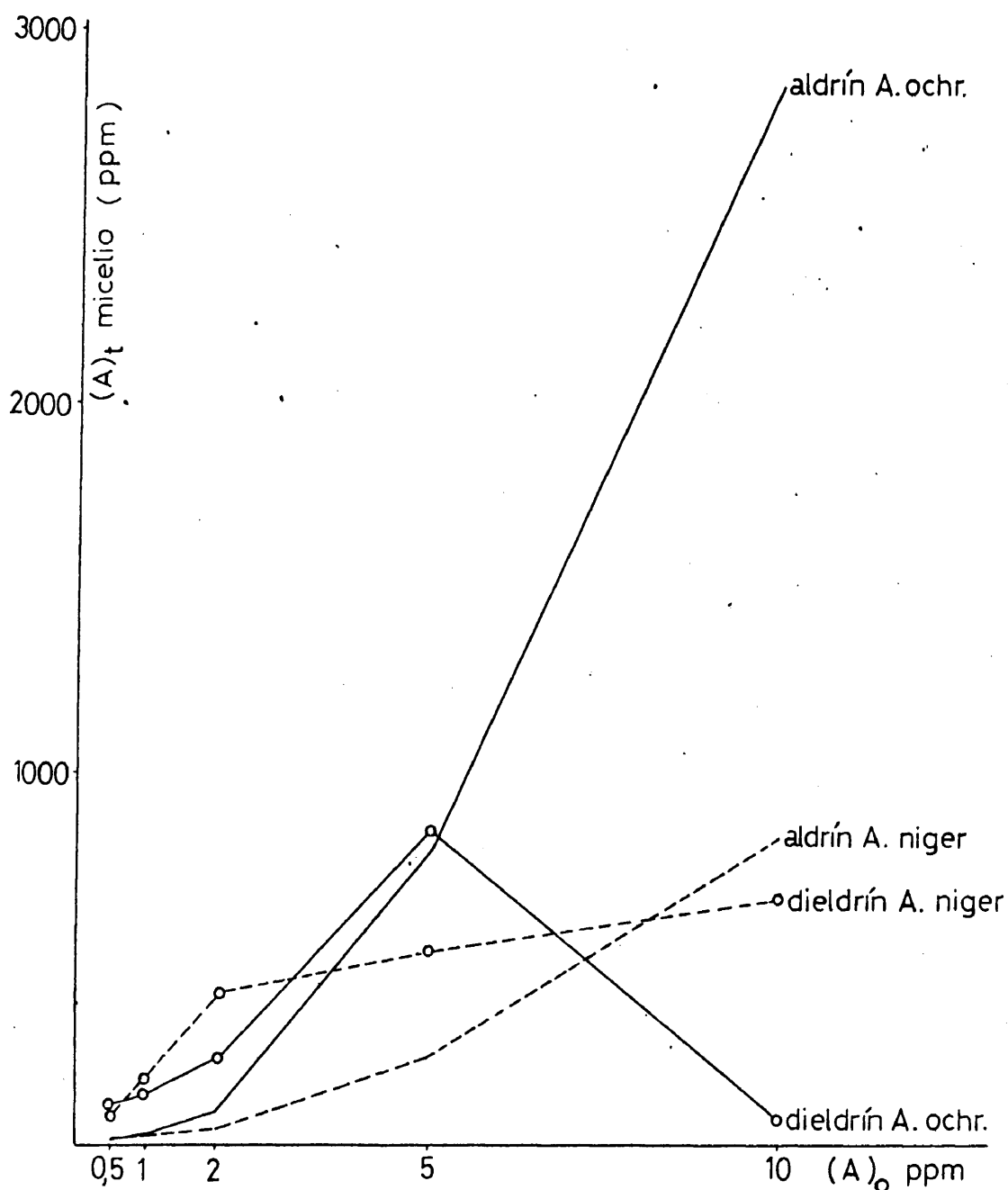


Fig. 23 - Contenidos de aldrín y dieldrín en el micelio de *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus niger* incubados en presencia de concentraciones variables de aldrín.

es fácil observar que, en general, decae a medida que se eleva la concentración inicial de insecticida que se añade al cultivo. Excepto en el caso de *A. flavus*, en el cual parece tener lugar un fenómeno de características opuestas o,

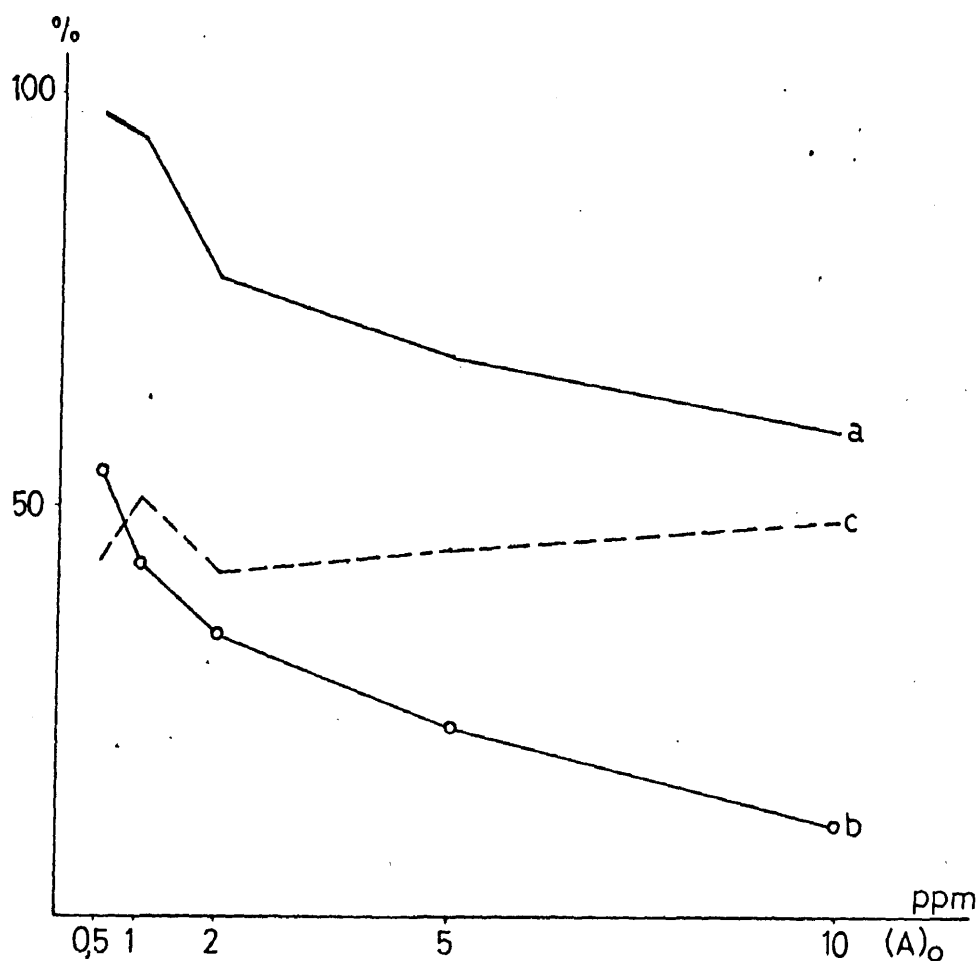


Fig. 24 - Variaciones en el metabolismo del aldrín--- por *Aspergillus terreus*, según la concentración inicial de insecticida.

a: % de aldrín transformado (total)
 b: % " " " en dielaldrín
 c: % " " " productos hidrofílicos

al menos, disimilares, tal descenso puede considerarse la norma: unas veces manifestándose de un modo notorio (*A. ochraceus*, figura 21), otras más moderadamente (*A. terreus*, figura 24 y, sobre todo, *A. niger*, figura 22) y por último, como en *P. chrysogenum* (figura 20), comenzando después de haber atravesado por un valor máximo.

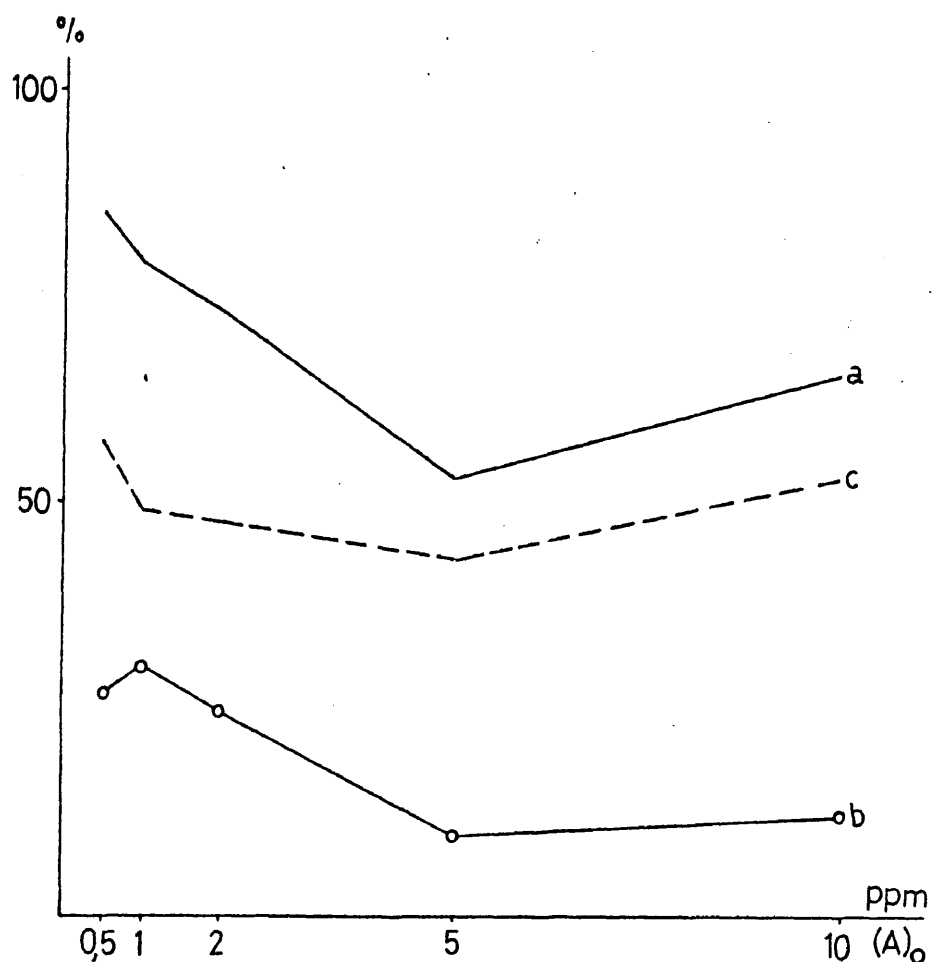


Fig. 25 - Variaciones en el metabolismo del aldrín--- por *Aspergillus flavus*, según la concentración inicial de insecticida.

a: % de aldrín transformado (total)
 b: % " " " en dieldrín
 c: % " " " " productos hidrofílicos

Pero no sólo, como los resultados obtenidos con *P.---* glaucum permitían suponer, se deja sentir la influencia de la concentración inicial de aldrín en las proporciones en que éste es metabolizado, sino que también parece determinar la vía a través de la cual va a experimentar la transformación o, por lo menos, el predominio de unas rutas sobre otras. Efectivamente, el examen de los gráficas adjun-

tas revela una tendencia, claramente marcada en ocasiones, a la preponderancia progresiva del proceso que resulta en la formación de metabolitos hidrofílicos, correlativa con el ascenso en la concentración inicial de aldrín. En otros casos no se registran incrementos sustanciales en la producción de tales metabolitos o incluso tal producción desciende (*A. ochraceus*, figura 21, y *P. chrysogenum*, figura 20), pero incluso en ellos los valores se mantienen más estables, contrastando con las más acusadas caídas de las vías que conducen a la formación de dieldrín.

Por otra parte, resulta interesante destacar el comportamiento ante el insecticida de *A. ochraceus*, especie en la que, aparentemente, se ha llegado, entre 5 y 10 ppm, al "techo" de sus posibilidades de transformación del aldrín: la brusca variación en el valor del pH final, la intensa caída en la producción de dieldrín y las evidentes anomalías que se registran en la acumulación de insecticida por el micelio cuando el hongo se desarrolla en presencia de concentraciones de 10 ppm de aldrín (compárese, en la figura 23, con lo que ocurre en otras especies), sugieren una especie de colapso o envenenamiento del cultivo en estas condiciones.

Todos estos resultados parecen hacer necesaria una revisión del concepto de vida media residual de un insecticida, particularmente cuando en su transformación desempeñan un papel preponderante los factores bióticos. La idea según la cual el tiempo necesario para que desaparezca el---

50 % del producto es una constante dependiente únicamente de la naturaleza del mismo y que no tiene relación con los aspectos cuantitativos del tratamiento insecticida, se apoya, más o menos directamente, en el supuesto de que la cinética implicada en el proceso es de primer orden. Tal supuesto, que a niveles metabólicos pierde rigor cuando se aplica a especies químicas susceptibles de dañar el mecanismo encargado de su transformación, y más todavía cuando los productos finales se forman a través de más de una ruta bioquímica, pudiendo a su vez actuar sobre la entidad transformadora, carece de confirmación experimental definitiva, manteniéndose en razón de que "... La concentración de los sustratos, en relación con el volumen total de los tejidos, es muy baja (alrededor de 10^{-9} M), y es probable que en los sitios de acción lo sea también. En estas circunstancias... la relación más simple es la que corresponde a un proceso de orden 1".⁷²

Ahora bien, las conclusiones deducibles de la anterior consideración, indudablemente aceptables en el caso de los seres de cierto tamaño, no pueden generalizarse a la totalidad de los seres vivos, ignorando las particularidades metabólicas presentes en los microorganismos, ya sean de tipo esferoidal o filamentoso, fundamentalmente como consecuencia de las diferencias que implica su relación superficie / volumen. Dada la magnitud del proceso de acumulación de insecticida por los hongos (véanse, por ejemplo, los valores correspondientes a *A. niger* y *A. flavus*: tablas 22 y 25), se comprenden fácilmente las posibles re

percusiones del fenómeno. Los cálculos (solamente aproximativos, pero no por ello carentes de valor) verificados con las especies estudiadas, llegan a dar valores para la concentración, supuesta una distribución homogénea de insecticida en el interior de las hifas, del orden de 10^6 veces superiores al anteriormente citado. La situación que, de otro lado, reflejan las tablas y gráficas a que venimos refiriéndonos, confirman (y de un modo notorio en *A. ochraceus*) las dudas expresadas en este apartado acerca del concepto de vida media residual de los insecticidas.

4 - REPERCUSION DEL INSECTICIDA SOBRE LOS MICROORGANISMOS.

En relación con este problema, al que ya se ha aludido en otras partes de esta memoria y que, evidentemente merecería un tratamiento más profundo, únicamente van a mencionarse dos hechos que, no obstante su consideración superficial, creemos de interés. En realidad, en todos los cultivos estudiados incluso una grosera apreciación a nivel meramente macroscópico revela variaciones morfológicas, y por ende fisiológicas, de los mismos, fácilmente relacionables con la presencia de insecticida y que van desde cambios graduales en el diámetro de los aglutinados esferoidales que forma el micelio cuando crece en medio líquido agitado, hasta alteraciones muy marcadas en la coloración tanto del micelio como del medio.

El primero de tales hechos consiste en la variación, dependiente de la presencia de aldrín, que, en cultivos en medio líquido (M₄, tabla VII) de *Aspergillus ochraceus*, experimentan los componentes del extracto etéreo del medio detectables por CGL con columnas apolares (I, tabla VIII). En las figuras 26 y 27 se reproducen los cromatogramas obtenidos por inyección en idénticas condiciones de soluciones estrictamente equivalentes correspondientes a dos cul-

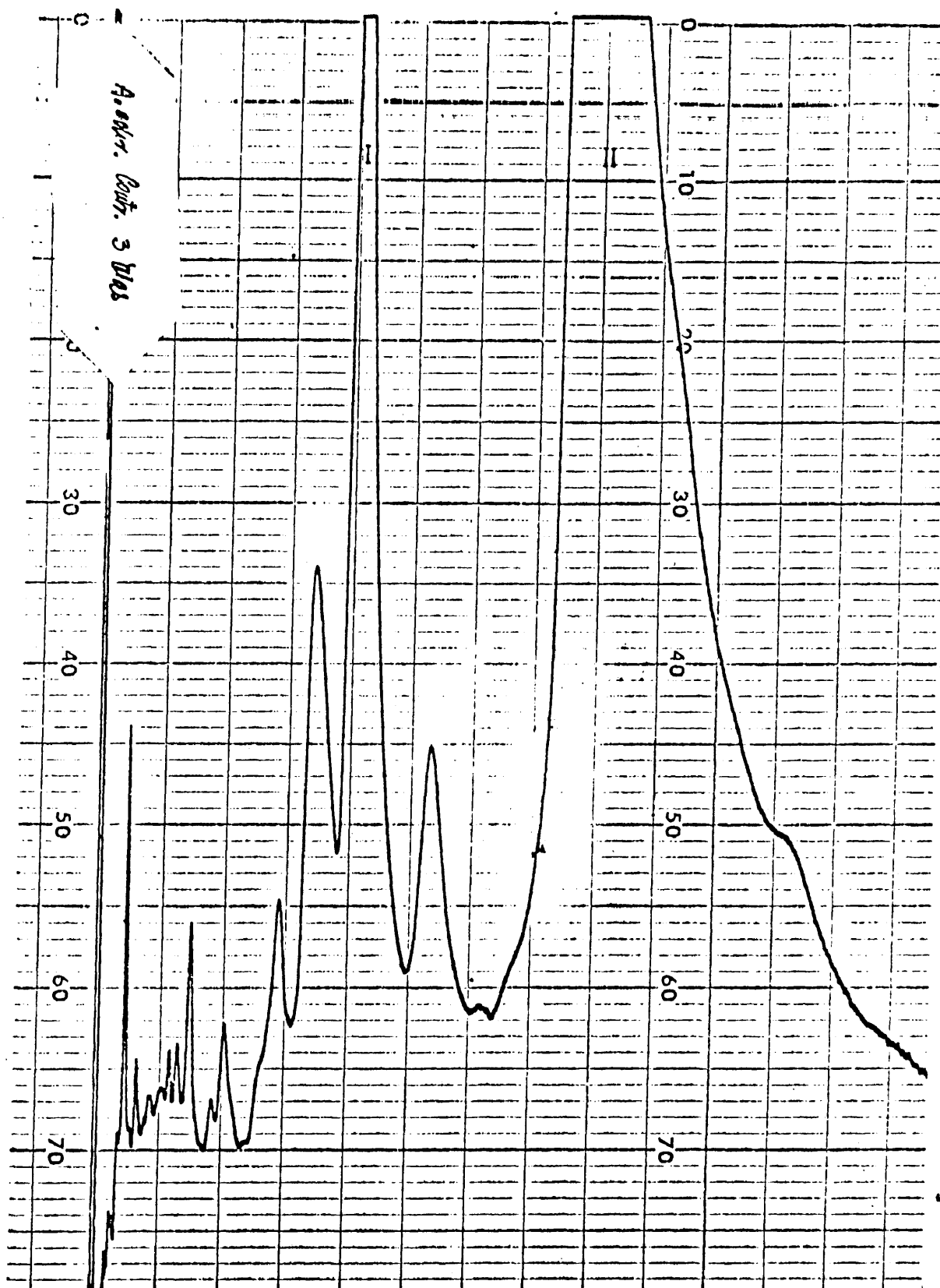


Fig. 26 - Cromatograma de un extracto del medio de cultivo de *Aspergillus ochraceus* desarrollado en ausencia de insecticida. Tiempo de incubación: 3 días.

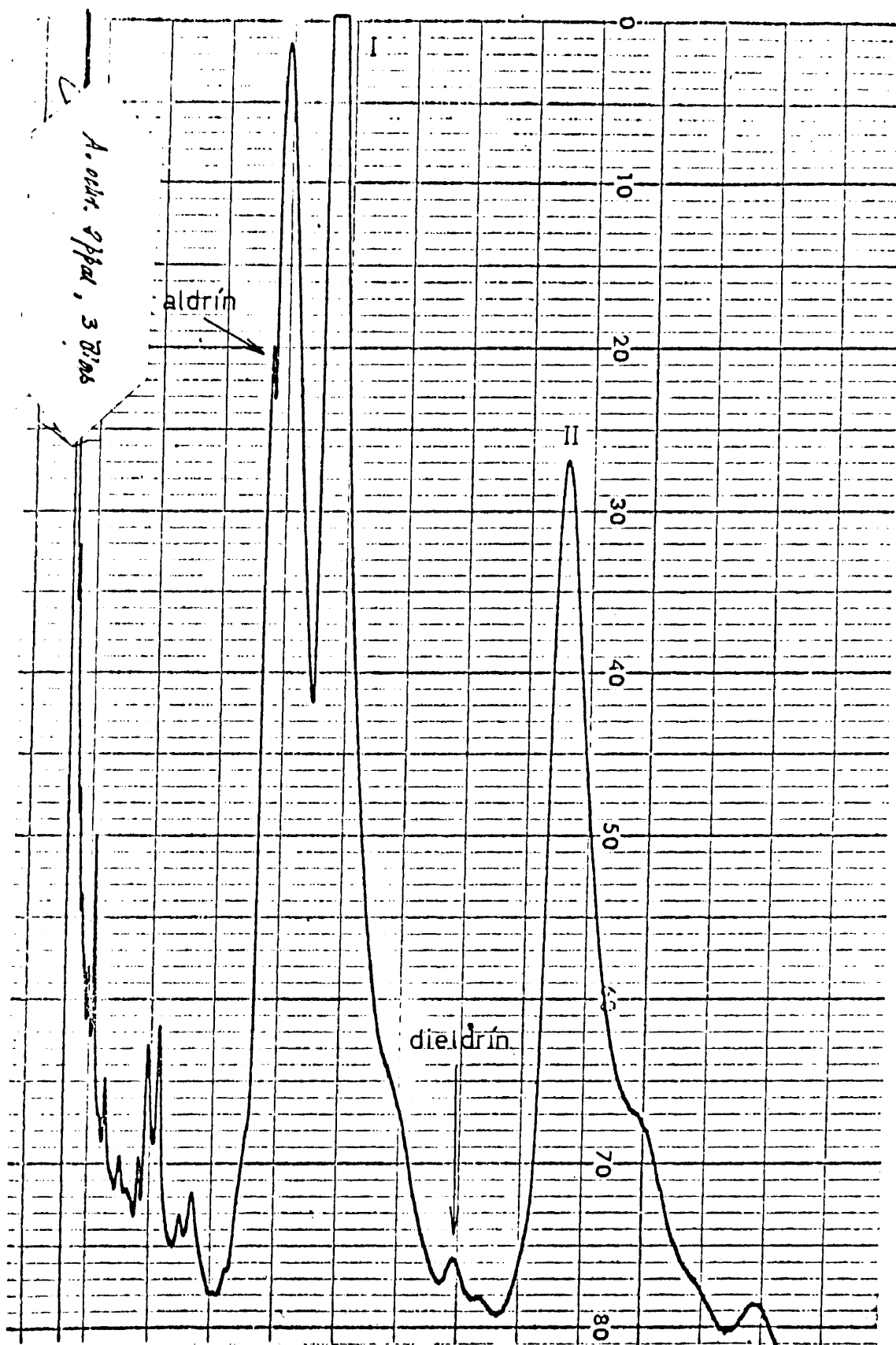
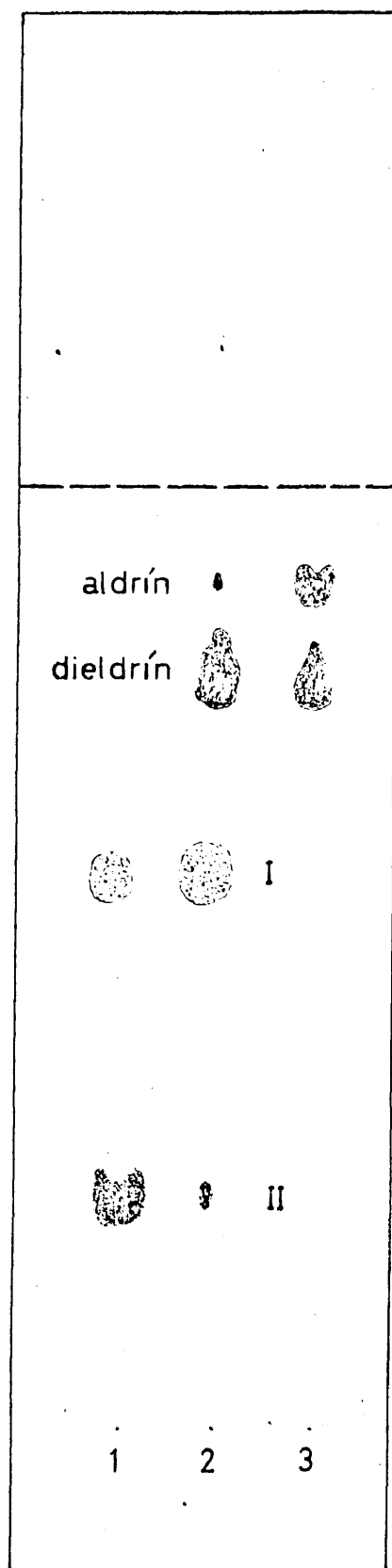


Fig. 27 - Cromatograma de un extracto del medio de--- cultivo de *Aspergillus ochraceus* desarrollado en presencia de 2 ppm de aldrín. Tiempo de incubación: 3 días.



tivos de *A. ochraceus*, después-- de un periodo de incubación de-- très días, en las formas típicas en que se han presentado en buen número de ocasiones, uno de ellos desarrollado en ausencia de al-- drín y el otro en presencia de-- una concentración inicial del--- mismo equivalente a 2 ppm. La es-- tricta reproductibilidad de es-- tos hechos, así como la nitidez-- de las señales cromatográficas,-- que se mantenían incluso en co-- lumnas de cierta polaridad, lle-- vó al intento de obtener cierta-- información adicional al respec-- to, efectuándose a este fin di-- versos ensayos por cromatografía en capa fina y columna.

Fig. 28 - Cromatograma de-- extractos de medios de cultivo-- de *Aspergillus ochraceus*.

- 1 - En ausencia de insecticida.
- 2 - En presencia de una concen-- tración inicial de 2 ppm de-- aldrín.
- 3 - Solución "standard" de al--- drín - dieldrín.

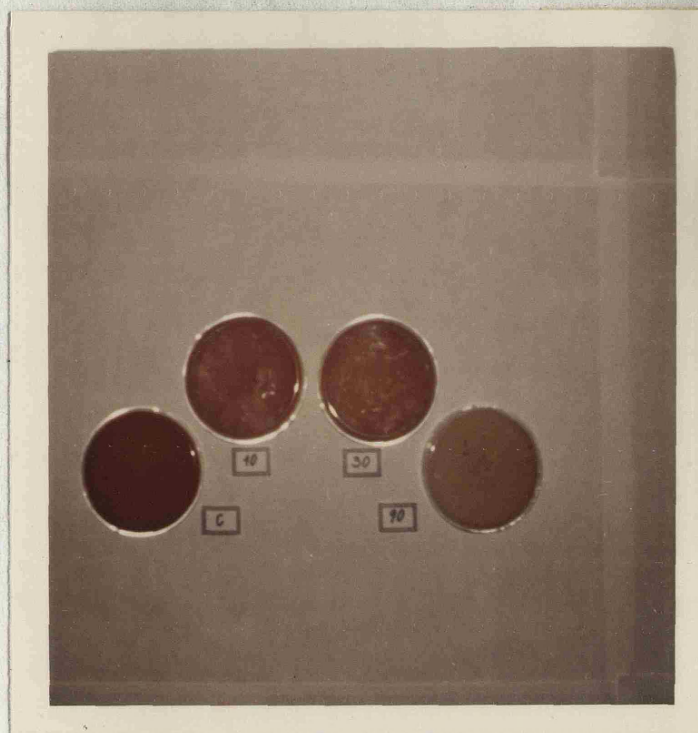


Fig. 29 - Aspecto de cuatro cultivos de *Penicillium*--
sp. desarrollados en presencia de concentraciones crecien-
tes de aldrín. De izquierda a derecha: sin insecticida; con
0,15 ug / cm² de aldrín; con 0,45 ug / cm² y con 1,35 ug /
cm². Tiempo de incubación: 8 días.

Mediante la primera de estas técnicas, y aplicando---
una metodología enteramente análoga a la utilizada para---
los insecticidas órganoclorados, fue posible evidenciar---
dos componentes, designados arbitrariamente como I y II,--
correspondientes con los que se habían designado de igual-
modo en los cromatogramas de las figuras 26 y 27. La figu-
ra 28 reproduce el cromatograma obtenido por cromatografía
en capa fina de los extractos etéreos de dos cultivos de--
A. ochraceus en condiciones análogas a las descritas para-
las pruebas por CGL. La capa adsorbente es de Silicagel G-.

(Stahl); el desarrollo se efectuó con isooctano - piridina (70 : 30) y el revelado con el reactivo cromogénico--ya mencionado, a base de NO_3Ag / 2-fenoxietanol.

Por cromatografía de adsorción en columna de Florisil (1,5 x 50 cm) se logró asimismo una separación aceptable utilizando la siguiente secuencia de elución:

100 ml hexano.....	eluye aldrín
150 " hexano - éter (93:7).....	" dieldrín
300 " " - " (25:75).....	" II
200 " éter - acetato de etilo (50:50).	" I

El componente II, que resultó hallarse en proporciones no excesivamente reducidas, presentó una apariencia lipídica, y los hechos conjuntos de su posibilidad de detección por captura electrónica y su susceptibilidad de revelado en capa fina por el método indicado, podrían interpretarse, en una primera aproximación, como indicios de un---fosfolípido.

Más destacadas todavía resultan las variaciones en la coloración del medio que se producen en cultivos sobre sustrato sólido (M_4 gelificado con agar, tabla VII) de un---*Penicillium* de especie indeterminada (véase el final de---este apartado) aislado ocasionalmente y en reducidas proporciones en algunos muestreos, cuando se desarrolla ante---concentraciones crecientes de aldrín. La figura 29 pone de manifiesto la inhibición progresiva de la pigmentación del

medio en tales circunstancias.

Comoquiera que este tipo de pigmentaciones en cultivos fúngicos acostumbran a estar determinadas por interacciones entre sustancias del sustrato y metabolitos, casi siempre de naturaleza aminoacídica o peptídica, que el microorganismo difunde en su entorno, se procedió a un intento de detección, al menos a un nivel grosero, de los componentes de tal naturaleza presentes en los extractos acuosos de cultivos desarrollados en ausencia y en presencia de aldrín, por cromatografía en capa fina y utilizando las metodologías que ya se han hecho clásicas en el estudio de aminoácidos: desarrollo con butanol - ácido acético - agua y revelado con ninhidrina.

Los cromatogramas obtenidos a partir de los cultivos con insecticida pusieron de relieve, como se había supuesto, una progresiva disminución, con respecto al caso de los cultivos en blanco, de las proporciones en que aparecían al menos tres componentes susceptibles de ser revelados con ninhidrina, hecho que apunta hacia una alteración del metabolismo de los aminoácidos en esta especie, provocada por la presencia de aldrín.

Puesto que en este caso no ha sido posible decidir con seguridad la posición sistemática del microorganismo en cuestión hasta el nivel específico, se da a continuación una descripción morfológica del mismo:

Estructura filamentosa de organización senocítica dicotómica, con finas hifas estériles de un diámetro comprendido entre 1,5 y 2 micras, e hifas fértiles provistas de esporangios abiertos (conidióforos) de disposición irregular, constituídos por cadenas de conidios elipsoidales, agrupados en pinceles dispuestos sobre métulas tabicadas, a su vez distribuidas en dos pisos. El primero está formado por tres métulas que se dicotomizan aproximadamente a mitad de su longitud y llevan en sus extremos largas cadenas de conidios, en número de 18 a 20.

P A R T E I V

R E S U M E N
D E L A S
C O N C L U S I O N E S

CONCLUSIONES

El desarrollo de la labor experimental de esta memoria, que ha tratado de ajustarse en lo posible al estudio de los tres aspectos que quedaron señalados en las páginas 65 y 66, ha permitido establecer una serie de conclusiones que pueden esquematizarse en los siguientes apartados:

1 - Mediante el ensayo sistemático de numerosos parámetros cromatográficos, ha sido posible la puesta a punto de una serie de condiciones operatorias idóneas para la detección de compuestos órganoclorados por CGL y que, aunque se evalúan fundamentalmente en función de su utilización-- en relación con el metabolismo de aldrín y dieldrín por microorganismos, la mayor o menor idoneidad encontrada en este campo puede hacerse en gran medida extensible al de su aplicación al problema, en la actualidad de elevado inte--rés, del análisis a nivel residual de la contaminación del medio por insecticidas órganoclorados.

Así, según la notación dada en la tabla VIII, pueden-- establecerse, entre las señaladas, dos categorías de con--diciones operatorias:

a) Columnas apolares en las condiciones de trabajo I:

rápida operación, elevada estabilidad y escasa selectividad. En ocasiones incapaces de resolver adecuadamente pares de señales correspondientes a productos de semejante polaridad (metabolitos M_1 y M_2 de *P. glaucum*). Útiles cuando se desea obtener información adicional de carácter general sobre las alteraciones determinadas en los metabolitos propiamente fúngicos por la presencia de insecticida.

b) Columnas de fase mixta en las condiciones II, III, V y VI: selectividad y eficiencia elevadas. Pueden presentar problemas derivados de la excesiva retención de metabolitos polares. Cuando hay sobrecarga de fase (II) pueden tener lugar dificultades debidas al "sangrado". Imprescindibles en el estudio de mezclas complejas de compuestos organoclorados y sus productos de transformación.

2 - Se han efectuado, a la luz de resultados ya obtenidos por otros autores, ya originales, determinadas puntualizaciones necesarias en torno al equívoco que supone la frecuencia con que el término "degradación" se introduce, de un modo que se ha visto carece de rigor, en la bibliografía referente a las transformaciones que afectan a los insecticidas aldrín y dieldrín en su interacción con los factores ambientales en general y los hongos del suelo en particular.

3 - Se han aportado nuevas evidencias, no sólo cualitativas, sino también cuantificadas, a favor de la existencia

cia de una multiplicidad, aparentemente rica, de metabolitos directamente derivados del aldrín, sin el concurso del dieldrín como estructura intermediaria, en cultivos puros de hongos aislados de suelos agrícolas, desarrollados en presencia de aquél insecticida.

4 - Como consecuencia del punto precedente, se ha subrayado la importancia de la significación del aldrín como contaminante del medio ambiente, independientemente de su relación con el dieldrín, insecticida este último que, por el volumen de publicaciones al mismo dedicadas durante el transcurso de los últimos años, parece ser considerado, injustamente, como paso obligado de mayor interés en el metabolismo del aldrín.

5 - Por primera vez, según se desprende de la bibliografía consultada, se ha prestado atención de modo sistemático a los efectos de las concentraciones iniciales de insecticida sobre su propia descomposición como consecuencia de la acción metabólica de los microorganismos. La cuantificación de los resultados obtenidos sobre este particular pone de manifiesto dos importantes implicaciones de aquel factor:

a) Su influencia en la magnitud de la transformación, hecho que, en unión de los valores hallados para el proceso de acumulación, ha permitido establecer ciertas bases para una reconsideración del concepto de vida media residual de un insecticida en un ecosistema, así como de los

aspectos cinéticos implicados en su transformación por entidades microbiológicas, desarrollos que, aunque en buena parte escapan a nuestras posibilidades, quedan someramente apuntados páginas más atrás.

b) Su repercusión sobre el predominio de unas u otras vías de transformación del aldrín: en efecto, ha quedado-- demostrado que, al menos en los intervalos estudiados, la elevación en la concentración inicial del insecticida determina, en el caso del *P. glaucum*, un descenso en la producción de M_1 y M_2 al tiempo que una progresiva preponderancia de la ruta que finaliza en el epóxido, mientras que en las especies productoras de proporciones importantes de metabolitos hidrofílicos es el mecanismo que los origina-- el que resulta favorecido.

6 - Han podido establecerse las rutas metabólicas a-- través de las cuales el aldrín es transformado en cultivos de *P. glaucum*, implicando un compuesto (M_1 = cetoaldrín) que no había sido dado hasta el momento como metabolito de aquel insecticida por acción de microorganismos, y se han analizado sus características y los factores que de algún modo las afectan.

7 - Se ha desarrollado, con aplicación al estudio del metabolismo de insecticidas por microorganismos, la metodología, nunca utilizada en trabajos precedentes, consistente en la operación con cultivos sobre sustratos sólidos,-- técnica que, presentando ciertas ventajas particularida-

des que fueron comentadas en relación con el estudio efectuado con *P. glaucum*, ha proporcionado, en todos sus aspectos, resultados enteramente satisfactorios.

8 - Han quedado señaladas por vez primera determinadas particularidades relacionadas con las alteraciones experimentadas por los microorganismos como consecuencia de su desarrollo en presencia de aldrín, y aunque no se ha dedicado a este tema más que una atención superficial, los resultados expuestos podrían constituir un punto de partida para ulteriores y más rigurosos tratamientos.

B I B L I O G R A F I A

BIBLIOGRAFIA CITADA

- 1 - Ayres, R.U. - "Los alimentos". En "Pronósticos del futuro". Alianza Editorial. Madrid (1970).
- 2 - Carson, R. - "Primavera silenciosa". Ediciones Ca ralt (1964).
- 3 - Gilmour, D. - "Metabolismo de los Insectos". Editorial Alhambra. Madrid (1968).
- 4 - Narahashi, T. - Residue Rev. 25, 275 (1969).
- 5 - Mullins, L.J. - Science, 122, 118 (1955).
- 6 - Soloway, S.B. - Adv. Pest Control Res. VI, 85 (1965).
- 7 - Baluja, G. - Contribución a las Lecciones del Cur so Formativo de Expertos de Seguridad en Agricultura. Ma--
drid (1968).
- 8 - Moore, N.W. - Revista de Agricultura y Ganadería. (enero, 1972).
- 9 - Brown, L. R. - Contribución a "La biosfera". Alian za Editorial. Madrid (1972).
- 10 - Robinson, J. - Chemistry in Britain, 4, Nº 4, 158 (1968).
- 11 - Dale, W.E.; Gaines, T.B.; Hayes, W.J.Jr. - Toxi-
col. and Applied Pharmacol. 4, Nº 1, 89 (1962).
- 12 - Andrews, A.K.; van Valin, C.C.; Stebbings, B.E.-
- Transact. of the American Fisheries Society, 95, Nº 3,--
297 (1966).
- 13 - Stickel, L.F. - Special Scientific Report Wild--
life Nº 119. Washington, D.C. (1968).

- 14 - Keith, J.A. - J. of Applied Ecology, 3 (Supplement), 57 (1966).
- 15 - Keith, J.O. - J. of Applied Ecology, 3 (Supplement), 71 (1966).
- 16 - Lutz-Ostertag, Y.; Lutz, H. - C. R. Acad. Sc. Paris, 269 (serie D), 484 (1969).
- 17 - Porter, P.E. - Information Bull. of I.U.P.A.C.,-
32, 111 (1968).
- 18 - Brooks, G.T. - Residue Rev. 27, 81 (1969).
- 19 - Matthews, H.B.; Matsumura, F. - J. Agr. Food----
Chem. 17, N^o 4, 845 (1969).
- 20 - Damico, J.N.; Chen, J.-Y.T.; Costello, C.E.; Haen
ni, E.O. - J. of the A.O.A.C. 51, N^o 1, 48 (1968).
- 21 - Richardson, A.; Baldwin, M.; Robinson, J. - J.--,
Sci. Food Agric. 19, 524 (1968).
- 22 - Heath, D.F.; Vandekar, M. - Brit. J. Ind. Med.--
21, 474 (1966).
- 23 - Ludwig, G.; Weis, J; Korte, F. - Life Sci. 3,---
123 (1964).
- 24 - Datta, P.R.; Laug, E.P.; Watts, J.O.; Klein, A.
K.; Nelson, M.J. - Nature, 208, 289 (1965).
- 25 - Hedde, R.D.; Davison, K.L.; Robbins, J.D. - J.--
Agr. Food Chem. 18, N^o 1, 116 (1970).
- 26 - Feil, V.J.; Hedde, R.D.; Zaylskie, R.G.; Zachri-
son, C.H. - J. Agr. Food Chem. 18, N^o 1, 120 (1970).
- 27 - Baldwin, M.K.; Robinson, J.; Carrington, R.A. -
- Proposed for publication to Nature (1971).
- 28 - Korte, F.; Arent, H. - Life Sci. 4, 2017 (1965).

- 29 - Korte, F.; Kochen, W. - Med. Pharmacol. Exp. 15, 404 (1966).
- 30 - Yu, S.J.; Kùgemagi, U.; Terriere, L.C. - J. Agr. Food Chem. 19, N° 1, 112 (1971).
- 31 - Lichtenstein, E.P.; Schulz, K.R.; Fuhremann, T.W.; Liang, T.T. - J. Agr. Food Chem. 18, N° 1, 100 (1970).
- 32 - Roburn, J. - Chem. Ind. 38, 1555 (1963).
- 33 - Robinson, J.; Richardson, A.; Bush, B. - Bull. Environmental Contamination and Toxicol. 1, N° 4, 127 (1966).
- 34 - Brown, V.K.H.; Robinson, J.; Richardson, A. - Fd. Cosmet. Toxicol. 5, 771 (1967).
- 35 - Baldwin, M.K.; Robinson, J. - Proposed for publication to Nature (1971).
- 36 - Klein, A.K.; Dailey, R.E.; Walton, M.S.; Beck, V.; Link J.D. - J. Agr. Food Chem. 18, N° 4, 705 (1970).
- 37 - Gannon, N.; Bigger, J.H. - J. Econ. Entomol. 51, 1 (1958).
- 38 - Lichtenstein, E.P.; Schulz, K.R. - J. Econ. Entomol. 53, 57 (1965).
- 39 - Lichtenstein, E.P.; Schulz, K.R.; Cowley, G.T. - J. Econ. Entomol. 56, 485 (1963).
- 40 - Korte, F.; Ludwig, G.; Vogel, J. - Annalen, 656, 135 (1962).
- 41 - Chacko, C.I.; Lockwood, J.L.; Zabik, M. - Science, 156, 959 (1967).
- 42 - Matsumura, F.; Boush, G.M. - Science, 156, 959-- (1967).
- 43 - Tu, C.M.; Miles, J.R.W.; Harris, C.R. - Life Sci. 7, 311 (1968).

- 44 - Poonawalla, N.H.; Korte, F. - J. Agr. Food Chem. 16, Nº 1, 15 (1968).
- 45 - Miles, J.R.W.; Tu, C.M.; Harris, C.R. - J. Econ. Entomol. 62, Nº 6, 1334 (1969).
- 46 - Bartha, R.; Lanzilotta, R.P.; Pramer, D. - Appl. Microbiol. 15, Nº 1, 67 (1967).
- 47 - De Faubert Maunder; Egan, H.; Codly, E.W.; Hammond, E.W.; Roburn, J.; Thompson, J. - Analyst, 89, 168,-- (1964).
- 48 - Onley, J.H.; Mills, P.A. - J. Ass. Off. A. Chemist. 45, 983 (1962).
- 49 - Kovacs, M.F. - J. Ass. Off. A. Chemist. 46, 884,-- (1963).
- 50 - Baluja, G.; Franco, J.M. - Agroquím. Tecnol. Alimentos, 11, Nº 1, 152 (1971).
- 51 - Baluja, G.; Dabrio, M.; Pereiro, M^ªE.; Franco, J. M.; Murado, M.A. - Agroquím. Tecnol. Alimentos, 9, Nº 1,-- 137, (1969).
- 52 - Baluja, G.; Dabrio, M.; Franco, J.M.; Murado, M. A.; Pereiro, M^ªE. - Agroquím. tecnol. Alimentos, 9, Nº 2,-- 266 (1969).
- 53 - Baluja, G.; Franco, J.M.; Murado, M.A.; Pereiro, M^ªE. - Agroquím. Tecnol. Alimentos, 9, Nº 4, 578 (1969).
- 54 - Baluja, G.; Franco, J.M.; Murado, M.A.; Pereiro, M^ªE. - Anales R. Soc. Esp. Fís. Quím. LXVI, 157, (1970).
- 55 - Baluja, G.; Castro, S.; Franco, J.M.; Murado, M. A. - Agroquím. Tecnol. Alimentos, 11, Nº 2, 260 (1971)
- 56 - Baluja, G.; Murado, M.A. - Proceedings II International I.U.P.A.C. Congress of Pesticide Chem. VI. Edited

by A.S. Tahori. Ness - Ziona. Israel (1972).

57 - Mc Culley, K.A.; Mc Kinley, W.P. - J. Ass. Off.-A. Chemist. 47, 652 (1964).

58 - Burke, J.A.; Holswade, W. - J. Ass. Off. A. Chemist. 49, 374 (1966).

59 - Dal Nogare, S.; Juvet, R.S. - "Gas - Liquid Chromatography"..Interscience Publishers Inc. New York (1965).

60 - Gascó, L. - "Teoría y práctica de la cromatografía en fase gaseosa". Ediciones J.E.N. Madrid (1969).

61 - Dewaux, P.; Guiochon, G. - Bull. Soc. Chim. France, 1404 (1966).

62 - Lovelock, J.E. - Anal. Chem. 33, 162 (1961).

63 - Jo-Yun T. Chen - J. of the A.O.A.C. 48, N° 2, --- (1965).

64 - Pochon, J.; Tardieux, P. - "Techniques d'analyse en Microbiologie du sol". Editions de la Tourelle. St. Mandé Seine (1962).

65 - Pramer, D.; Schmidt, E. - "Experimental Soil Microbiology". Burgers Publishing. Minneapolis. (1965).

66 - Henrici's - "Molds, Yeasts and Actinomycetes". Ed. John Wiley and Sons Inc. New York (1947).

67 - Schmidt - "An Introduction to Industrial Mycology". Edward Arnold and Co. Ltd. London (1946).

68 - Raghu, K.; Mc Rae, I.C. - Science, 154, N° 3746, - 263 (1966).

69 - Biros, F.J. - Residue Rev. 40, 1 (1971).

70 - Mumma, R.O.; Kantner, T.R. - J. Econ. Entomol. 59, N° 2 (1966).

71 - Matsumura, F.; Boush, G.M.; Tai, A. - Nature, 219, 965 (1968).

72 - Report of the Secretary's Commission on Pesticides and Their Relationship to Environmental Health (Parts I and II). U.S. Department of Health, Education and Welfare.-- Washington (1969).